

Zur Frage der hormonalen Regulation der Eireifung
bei Insekten

von
Günter Weirich

1963

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München
Komm. Direktor: Prof.Dr.P.Karlson

ZUR FRAGE DER HORMONALEN REGULATION DER EIREIFUNG BEI INSEKTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter W e i r i c h
aus Eisenach/Thür
1963
Mai



Berichterstatter: Prof. Dr P Karlson
Mitberichterstatter: Prof. Dr H Autrum

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1963

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Karlson in der Zeit von März 1960 bis Februar 1963 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Für die Anregung zu dieser Arbeit und das stets fördernde Interesse an ihrem Fortgang danke ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Peter Karlson, sehr herzlich.

Für die freundliche Aufnahme in die Gemeinschaft des Max Planck-Instituts für Biochemie bin ich Herrn Prof. Dr. Adolf Butenandt zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Das Zoologische Institut der Universität München stellte uns Gelege von *Calliphora erythrocephala* zur Verfügung, das Wuppertaler Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG überließ uns *Aedes aegypti*-Gelege. Beiden sei an dieser Stelle für ihre Hilfe vielmals gedankt.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548306_0069

GLIEDERUNG

A Einleitung

B Gegenstand der Arbeit

I. Grundlagen

II. Ziel der Arbeit

III. Material und Methoden

IV. Eigene Versuche

a) zur Frage der vitellogenen Aktivität der Corpora allata (bzw von analog wirkenden Stoffen):

1. Normalverlauf der Ovarentwicklung und kritische Periode bei *Aedes aegypti*
2. Injektionen von Insekten-Lipidextrakten in *Aedes*-Weibchen
3. Injektionen von Farnesol oder Farnesyldiäthylamin in *Aedes*-Weibchen
4. Normalverlauf der Ovarentwicklung bei *Calliphora erythrocephala*
5. Injektionen von Farnesol oder Farnesolderivaten in *Calliphora*-Weibchen
6. Injektionen von Insekten-Lipidextrakten in *Calliphora*-Weibchen

b) zur Frage der Stoffwechsel-stimulierenden Aktivität der Corpora allata:

Der Sauerstoffverbrauch von *Aedes aegypti*-Weibchen während der beginnenden Ovarreifung

V. Diskussion der Ergebnisse

C Zusammenfassung

D Literaturübersicht

EINLEITUNG

HOPKINS hat das Leben als ein "dynamisches Gleichgewicht in einem polyphasischen System" definiert. Für das Funktionieren eines solchen aus vielen Zellen, Geweben und Organen bestehenden Systems und seine Einordnung in die Umwelt bedarf es wohlentwickelter Koordinierungsmechanismen. Die Natur hat dafür zwei Prinzipien "erfunden", das schnell funktionierende der nervösen und das langsamere der humoralen Regulation. Diese beiden Prinzipien sind in verschiedenem Grad der Differenzierung bei fast allen Lebewesen zu finden. Die Kybernetik liefert uns heute die theoretischen Voraussetzungen nicht nur zum Verständnis, sondern auch für die Analyse solcher Regelungssysteme. (1)

In den letzten Jahren sind in zunehmendem Maße Insekten für derartige Untersuchungen herangezogen worden. Die Untersuchungen der Kybernetiker und Sinnesphysiologen brachten Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen den von Insekten aufgenommenen Sinnesreizen und ihren motorischen Reaktionen bzw. Verhaltensweisen (2,3). Die Entdeckung der Sozialwirkstoffe oder Pheromone bei Insekten warf neue Fragestellungen sowohl für die Sinnesphysiologie als auch für die Biochemie auf (4). Mit der Reindarstellung des Ecdysons, des Häutungshormons der Insekten, durch BUTENANDT und KARLSON (5) wurden der experimentellen Endokrinologie neue Wege eröffnet.

Es war nun möglich, an einem leicht zugänglichen Tiermaterial (wie es die Insekten darstellen) umfangreiche Versuche über die Abhängigkeit von Entwicklungsvorgängen und den Mechanismus ihrer Steuerung durch Hormone anzustellen (6-9). Diese teils biochemischen, teils cytologischen Arbeiten haben uns neue Vorstellungen über die Wirkungsweise von Hormonen vermittelt (10,11) und gewinnen dadurch über den Rahmen der Insektenphysiologie hinaus eine allgemeine Bedeutung für die vergleichende Endokrinologie (12).

In der vorliegenden Arbeit wird ein Teilvorgang der humoralen Regulation in erwachsenen Insekten behandelt, und zwar die Steuerung der Eireifung durch die Corpora allata.

GEGENSTAND DER ARBEIT

I. GRUNDLAGEN

a) Die Anatomie der Corpora allata

Die Corpora allata sind die ersten Organe, die bei Insekten als Drüsen innerer Sekretion beschrieben wurden (13,14). Sie kommen ausnahmslos bei allen pterygoten Insekten vor. Es handelt sich um primär paarige, abgerundete Organe, die im Kopf, Hals oder Thorax der Insekten liegen. Die C.allata sind stets vom Gehirn aus innerviert, und zwar mittelbar über die vor ihnen liegenden Corpora cardiaca, mit denen sie immer in nervöser Verbindung stehen und oft auch äußerlich verschmolzen sind. Bei einigen Insektenarten besteht eine zweite Nervenverbindung zum Unterschlundganglion (z B Leucophaea, Blattaria). Beide Corpora liegen in den Imagines der Aorta dorsal an, sie werden zusammenfassend als retrocerebrales Drüsensystem bezeichnet. Eine ausführliche Darstellung dieses Systems bei verschiedenen Insektenordnungen hat HANSTRÖM 1942 (15) gegeben.

Bei den Larven der cyclorrhaphen Dipteren sind die Organe des retrocerebralen Systems mit einem der Prothorakaldrüse homologen Organ verschmolzen. Sie bilden zusammen die Ringdrüse (= Weismannscher Ring), die die vordere Aorta umschließt. Wenn in den Imagines die seitlichen, den Prothoraxdrüsen entsprechenden Teile atrophieren, werden die zu einem unpaaren Organ verschmolzenen Corpora allata und die C. cardiaca einzeln erkennbar (16,17).

b) Morphogenetische Wirkungen der Corpora allata während der Jugendentwicklung

Die Corpora allata haben sowohl im larvalen als auch im adulten Organismus wichtige Funktionen zu erfüllen. Am längsten bekannt sind ihre Wirkungen auf die Morphogenese. Die Entwicklung der Insekten erfolgt in einzelnen abge-

grenzten Wachstumsschritten, deren äußeres Merkmal die Häutungen sind. Eine solche Häutung (im engeren Sinne) besteht im Abstreifen der alten Cuticula, in einem weiteren Sinne versteht man darunter alle Vorgänge, die zur Bildung der neuen Cuticula führen. Das Inkret der *C. allata* bewirkt bei diesen Häutungen die Erhaltung der larvalen und die Unterdrückung der adulten Eigenschaften und Merkmale des Integuments (18). Man nennt es deshalb nach WIGGLESWORTH (19) Juvenilhormon (= Neotenin).

Anatomisch läßt sich zeigen, daß die relative Größe der *C. allata* im Verhältnis zur Körpergröße während der Jugendentwicklung fortlaufend abnimmt ("negativ allometrisches Wachstum"). Daraus und aus histologischen Befunden ergibt sich eine geringer werdende Hormonbildungskapazität (20,21). Das Ende der Jugendentwicklung ist durch Häutungen charakterisiert, die bei sehr geringer Konzentration oder völligem Fehlen des Juvenilhormons in der Hämolymphe stattfinden. Dennoch ist die Gegenwart der *C. allata* für diesen letzten Entwicklungsschritt nicht völlig bedeutungslos, wie Versuche von WIGGLESWORTH (22), BODENSTEIN (23) u. a. gezeigt haben. Welche Rolle sie speziell bei diesem Vorgang spielen, ist jedoch noch nicht sicher bekannt.

WIGGLESWORTH diskutierte 1948 (22) aufgrund abgestufter Decapitations- und Parabioseversuche die Möglichkeit einer aktiven Eliminierung des zum Zeitpunkt der Metamorphose noch im Körper vorhandenen Juvenilhormons, fand jedoch 1952 (24) in weiteren Versuchen diese Hypothese nicht bestätigt.

Die übereinstimmende Erfahrung verschiedener Autoren ist, daß die Abwesenheit des Juvenilhormons während der Metamorphose für die Degeneration der Prothoraxdrüsen verantwortlich ist (18,25,26). Sowohl durch rechtzeitige Implantation jüngerer *C. allata* (20) als auch durch Applikation juvenilhormonhaltiger Extrakte (26,27) oder Wirkstoffe (28) kann man die Prothoraxdrüsen auch über den Zeitpunkt der Imaginalhäutung hinaus erhalten. Solche Tiere entsprechen dann freilich auch in ihrer äußeren Morphologie nicht Imagines, sondern sie zeigen stark ausgeprägte larvale Merkmale. Als einen Ausdruck

ihrer auch innerlich unterdrückten Metamorphose kann man die Erhaltung der Prothoraxdrüsen betrachten.

Bei Termiten und sozialen Hymenopteren zeigen die *C. allata* in Vertretern der verschiedenen Kasten Größen- und Aktivitätsunterschiede (20). Daraus wurde auf eine besondere Funktion bei der Determination (Arbeitsteilung) geschlossen (20,29). Auch die Phasendifferenzierung der Wanderheuschrecken wird durch die *C. allata* beeinflusst (30).

Viele entwicklungsabhängige Farbwechselvorgänge (sei es durch Pigmentneubildung oder -verlagerung) sind von den *C. allata* gesteuert. (31,32-34).

c) Funktionen der Corpora allata in erwachsenen Insekten

Histologische Befunde

Bei fast allen untersuchten Spezies nehmen die *C. allata* im Imaginalstadium beträchtlich an Größe zu. Auch histologische Veränderungen sprechen für ein Wiedereinsetzen oder Anwachsen ihrer inkretorischen Tätigkeit. Bei vielen Arten unterscheiden sich die Geschlechter im Ausmaß dieser Aktivierung; meist sind die *C. allata* der Weibchen größer und aktiver als die der Männchen (20). Außerdem lassen sich bei weiblichen Tieren periodische Änderungen des Aktivitätszustandes nachweisen, die mit den Ovulationszyklen korreliert sind (35).

Sauerstoff-Verbrauch

Das (od. die) Hormon (e) der *C. allata* haben einen deutlichen Effekt auf verschiedene Stoffwechselvorgänge. Als ein äußeres Merkmal dieser Wirkungen haben viele Autoren den Sauerstoff-Verbrauch von Insekten vor und nach Allatektomie bzw. Implantation von *C. allata* studiert. Die Mehrzahl der Beobachtungen spricht für eine Erhöhung des respiratorischen Stoffwechsels durch aktive *C. allata* (36-41). Das Ausmaß, in dem der Sauerstoff-Verbrauch von *C. allata*-Inkret beeinflusst wird, ist allerdings von Art zu Art sehr verschieden, und manche Ergebnisse lassen vermuten, daß einige Zeit nach der Allatektomie

die Atmungsaktivität durch ein anderes System kontrolliert wird. Die Unterschiede zu intakten oder scheinoperierten Tieren verschwinden (41,42) oder können sogar ins Gegenteil verkehrt sein, d h die allatektomierten Tiere atmen dann stärker als die Kontrollen (43,44).

Protein- und Fettstoffwechsel

Die *C. allata* regulieren die Protein- und Fettsynthese der Insekten; ihre Entfernung bedingt bei erhöhtem Aminosäurespiegel in der Hämolymphe eine vermehrte Fettablagerung auf Kosten der Proteinbildung. Auch die Gewebskohlenhydrate werden erhöht (31,45-47).

Gonadotrope Wirkungen

Einen erheblichen Einfluß haben die *C. allata* auf die Funktion der Geschlechtsorgane der Insekten, hauptsächlich die der Weibchen. Im männlichen Geschlecht konnten nur bei Rhodnius (Heteroptera) (48) und Calliphora (Diptera) (49) schwache Wirkungen auf das Wachstum und die Sekretionsintensität der Anhangsdrüsen festgestellt werden, während die Testes in allen untersuchten Fällen von den *C. allata* unabhängig waren. Auch auf die weiblichen Anhangsdrüsen üben die *C. allata* nur einen verhältnismäßig schwachen Einfluß aus (50-52). Für die normale Funktion der Ovarien sind sie dagegen unentbehrlich, wie unten noch näher ausgeführt wird.

DAY (53) hielt die Stoffwechselstimulierung für die primäre Funktion der *C. allata* und sah in anderen, z B der gonadotropen Aktivität, Sekundärwirkungen. Andere Autoren vertreten die entgegengesetzte Ansicht, nämlich, daß die Erhöhung der Stoffwechselleistung nur die notwendige Folge einer Gewebs-(Ovarien-)aktivierung sei (20a,39,40).

Nach Ovariectomie wird die Sauerstoffaufnahme von Calliphora erythrocephala nicht vermindert (37), und kastrierte Leucophaea maderae Weibchen (Blattaria) reagieren auf *C. allata*-Implantation mit einer Erhöhung der Atmungsaktivität (41). Für die *C. allata*-abhängige Stoffwechselsteigerung sind demnach die Ovarien nicht erforderlich.

Diese Erfahrung wurde durch Versuche an Gewebshomogenaten (38) und Sarkosomen (54) des Kartoffelkäfers bestätigt. Durch Zusatz von Homogenaten oder Extrakten der *C. allata* konnte die Atmung dieser in-vitro-Systeme erhöht werden.

Man wird also annehmen dürfen, daß die *C. allata* regulierend

in verschiedene physiologische Vorgänge eingreifen, deren Zusammenspiel für den ungestörten Ablauf von Entwicklungs- und Reproduktionsleistungen wichtig ist.

d) Corpora allata und Eireifung

Autogenie und Anautogenie der Eibildung

Bezüglich ihrer Oogenese können wir bei Insekten zwei verschiedene physiologische Verhaltenstypen unterscheiden. Die einen sammeln während ihres Larvenlebens genügend Nährstoffe, um Eier zu bilden. Die weiblichen Imagines schlüpfen dann entweder mit völlig funktionsbereiten Ovarien (Ephemeriden, Plecopteren, Cicadiden und viele Lepidopteren), oder die Ovarien reifen in der jungen Imago auf Kosten der im Fettkörper vorhandenen Reservestoffe (Sphingiden, Bombyciden). Bei der anderen Kategorie ist vor der Reproduktionstätigkeit ein sogenannter "Reifefraß" nötig. Im ersten Fall spricht man von autogener Eibildung, im anderen von anautogener. Anautogene Oogenese kommt bei vielen Dipteren und Homopteren vor.

Merkwürdigerweise haben zuweilen nahe verwandte Arten, ja sogar Unterarten, einmal autogene, zum anderen anautogene Eibildung. Dies ist nicht durch Unterschiede in der Ernährungsphysiologie zu erklären. Auch die Weibchen anautogener Stechmückenarten haben in ihren Geweben genügend Nährstoffreserven für die Produktion einer ersten Eigeneration (55-57). Der Unterschied zwischen Autogenie und Anautogenie beruht hier also wahrscheinlich auf dem verschiedenen Reaktionsvermögen der *C. allata*, das seinerseits genetisch festgelegt ist (58).

Physiologie der Eireifung und Bedeutung der *C. allata*

In der Oogenese der Insekten lassen sich zwei Phasen unterscheiden. Während der ersten wachsen die Oocyten unter Verbrauch der Nährzellreserven, in dieser Zeit wird hauptsächlich Ooplasma eingelagert. In der zweiten Phase entnehmen die Follikelzellen Nährstoffe aus der Hämolymphe und geben sie an die Eizellen ab. Diese zweite Phase umfaßt die Dotterbildung.

Die Bedeutung der Corpora allata für die Eireifung wurde zuerst von WIGGLESWORTH 1936 (48) an Rhodnius prolixus erkannt. Seitdem ist sie auch für viele anderen Insektenarten experimentell nachgewiesen worden (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Ovaritrope (vitellogene) Wirkungen der Corpora allata

<u>Überordnung</u> Ordnung	Art	nachgewiesen durch	Lit.- zitat
<u>Orthopteroidea</u>			
Saltatoria	Melanoplus differentialis	Weed-Pfeiffer, 1936	50
Dermaptera	Ohrwurm (?)	Ozeki, 1949	59
<u>Blattoidea</u>			
Blattaria	Leucophaea maderae	Scharrer B., 1946	51
		Engelmann, 1957	52
	Periplaneta americana	Girardie, 1962	60
<u>Hemipteroidea</u>			
Heteroptera	Rhodnius prolixus	Wigglesworth, 1936	48
	Oncopeltus fasciatus	Johansson, 1954	61
	Pyrrhocoris apterus	Novak, 1959	39
<u>Coleopteroidea</u>			
Coleoptera	Dytiscus	Joly, 1945	62
	Carabus	Joly, 1950	63
	Leptinotarsa decemlineata	de Wilde, 1960	54
<u>Neuropteroidea</u>			
Diptera	Drosophila	Vogt, 1940/43	64-66
	Calliphora	Thomsen, 1942	49
	Lucilia,	Day, 1943	53
	Sarcophaga		
	Anopheles	Detinova, 1945	67
	Aedes	Gillett 1956/57	68, 69
	Aedes, Culex	Larsen u. Bodenstein, 1959	70

Das übereinstimmende Ergebnis all dieser Untersuchungen ist, daß nach Ausfall der C. allata (-aktivität) die Weibchen nicht in der Lage sind, voll ausgebildete, reife Eier zu produzieren. Die Entwicklung der Oocyten in den Ovariolen bleibt auf dem Stadium stehen, in dem normalerweise die Einlagerung des Dotters beginnen sollte, und nach einiger Zeit werden die Oocyten resorbiert (48,53,49,50,63,71).

Hormonale Natur der C. allata-Wirkung

Da es zwischen den C. allata und den Ovarien der Insekten keine Nervenverbindung gibt, lag es nahe, den Einfluß jener auf einen Wirkstoff zurückzuführen. Diese Annahme hat sich in zahlreichen Versuchen bestätigt:

1. Durch Reimplantation der C. allata können die durch Extirpation verursachten Defekte aufgehoben werden (49).
2. Werden Ovarien aus Weibchen, die infolge Allatektomie oder Nahrungsmangels keine Eier bilden können, in normale Weibchen verpflanzt, so entwickeln sich die Oocyten in den Transplantaten (49,70).
3. Der ovarienaktivierende Faktor wird zwischen Tieren, die in Parabiose miteinander verbunden sind, über die Hämolymphe ausgetauscht (48).
4. Auch durch Hämolymphttransfusion läßt sich dieser Faktor von einem Individuum auf ein anderes übertragen (72).

Die C. allata der erwachsenen Insektenweibchen produzieren also ein Hormon, welches für die Einlagerung des Dotters in die reifenden Oocyten notwendig ist. Im Hinblick auf diese Funktion ist die Bezeichnung "vitellogenes Hormon" (73) unter allen dafür benutzten die präziseste.

Art- und Geschlechtsspezifität des Hormons

Dieses Hormon wird nicht nur von den C. allata der Weibchen gebildet, sondern ebenso im männlichen Organismus. Dies haben Versuche von WIGGLESWORTH an Rhodnius (48) gezeigt, bei denen er durch Parabiose von intakten Männchen mit decapitierten Weibchen in letzteren die Ovarienreife aufrechterhalten konnte. THOMSEN (49) machte dieselbe Erfahrung an Calliphora

nach Transplantation von inaktiven Ovarien in Männchen oder von männlichen *C. allata* in allatektomierte Weibchen. Das Hormon der adulten *C. allata* ist also nicht geschlechtsspezifisch.

Außerdem ist die Wirkung nicht auf eine Art beschränkt, das Hormon scheint auch artunspezifisch zu sein. Zu diesem Ergebnis führten analoge Transplantations- und Parabioseversuche, die sich sowohl zwischen nahe verwandten Arten (Triatoma - Rhodnius (48), Calliphora - Lucilia (49), Culex-Aedes (70) als auch zwischen Vertretern verschiedener Ordnungen (Calliphora - Rhodnius (74) mit Erfolg durchführen ließen. M. VOGT fand allerdings bei heteroplastischen Transplantationsversuchen an Drosophila, daß sich die *C. allata* verschiedener Spezies nicht beliebig austauschen lassen (64-66).

Abweichende Befunde

Die Abhängigkeit der Ovarientätigkeit der Insekten von den *C. allata* ist nicht in allen Fällen so eindeutig wie in den geschilderten Beispielen. Bei Lepidopteren konnte die Ovarentwicklung weder durch Allatektomie auf einem späten Larvenstadium (75-78) noch durch Isolierung der Puppenabdomines (79,80) unterdrückt werden. Wohl aber ließ sich eine quantitative Differenz zwischen der Ovarleistung von intakten und allatektomierten Weibchen finden (78). Dasselbe gilt für die Stabheuschrecke Carausius morosus, die zwar keine Abhängigkeit der Ovarreife von den *C. allata* im Sinne einer Alles-oder-nichts-Reaktion zeigt, wohl aber Unterschiede in der mit oder ohne *C. allata* produzierten Eimasse (42). Es ist denkbar, daß die *C. allata* bei diesen Insekten schon sehr früh (während der letzten Larvenstadien) mit der Produktion des vitellogenen Hormons beginnen und daß dieses dann in den Geweben gespeichert wird.

Die bei anderen Insektenordnungen übliche Regelung der Reproduktionstätigkeit ist bei den Schmetterlingen im allgemeinen überflüssig, weil sie in den Larvenstadien genügend Nährstoffe für die Bildung ihrer Eier aufnehmen und deren Produktion bereits im Puppenstadium erfolgt oder zumindestens beginnt.

Für die starke Größenzunahme, die die *C. allata* adulter Lepidopteren zeigen (20), gibt es bislang keine Erklärung, denn nach Allatektomie treten auch an anderen Organen keine

signifikanten Störungen auf.

Steuerung der Corpora allata-Funktion

Wie werden nun die Corpora allata nach einer Periode relativer Ruhe (während der Metamorphose) zu erneuter und oft periodisch wechselnder sekretorischer Aktivität angeregt, und auf welche Weise wird ihre Tätigkeit kontrolliert?

Einige experimentelle Arbeiten an Insekten mit anautogener Eibildung zeigen hier einen Zusammenhang zu nervösen und humoralen Regulationsmechanismen auf.

Aktivierung bei blutsaugenden Insekten

Bei den anautogenen Stechmückenarten Culex pipiens und Aedes aegypti werden die C. allata erst nach einer Blutmahlzeit aktiv. Werden die Weibchen nur mit Zuckerlösung oder Fruchtsaft gefüttert, so können sie zwar für längere Zeit überleben, bilden jedoch keine Eier (70).

Die Aufnahme der Blutmahlzeit bzw die damit verbundene Ausdehnung des Mitteldarms ruft einen Impuls zum Gehirn hervor, der mit großer Wahrscheinlichkeit nervöser Natur ist. Dieser Impuls löst im Gehirn eine zweite Erregung aus, die zur Aktivierung der C. allata und damit indirekt zur Reifung der Ovarien führt.

Diese Kette von Ursachen und Wirkungen kann an verschiedenen Stellen unterbrochen werden. Wird der Kopf mit seinen aktivierenden Zentren kurze Zeit nach der Blutmahlzeit entfernt, so bleibt die Sekretion der im vorderen Thorax liegenden C. allata unzureichend, und es tritt keine Ovarreifung ein. Wird der Thorax vom Abdomen abgeschnürt, so produzieren zwar die C. allata noch das Hormon, dieses kann infolge der Ligatur jedoch nicht mehr zu den Ovarien gelangen. Auch in diesem Falle bleibt die Reifung der Oocyten aus.

Einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus hat WIGGLESWORTH bei Rhodnius prolixus (Heteroptera) gefunden. Bei diesem blutsaugenden Insekt ist die Aktivierung des gesamten häutungsauslösenden Systems einschließlich der C. allata von einer prallen Füllung des Mitteldarms abhängig. Sowohl durch

Decapitation der Tiere als auch durch Unterbrechung des ventralen Nervenstranges im Thorax wird diese Aktivierung verhindert (81).

Aktivierung bei nicht blutsaugenden Insekten

Bei den Vertretern dieser Gruppe ist die Induktion der Eireifung nicht von einer so auffälligen Darm- und Abdominalschwellung abhängig. Das heißt, eine ähnliche nervöse Erregung wie in den oben geschilderten Beispielen ist hier als Stimulus für die *C. allata* unwahrscheinlich.

Bei *Calliphora* sind Proteine oder Proteinbausteine möglicherweise an der Auslösung und sicherlich an der Aufrechterhaltung der *C. allata*-Aktivität beteiligt (82,83).

Rückwirkungen auf die *C. allata*

Ein besonders vollständiges und übersichtliches Bild über die nervös-humorale Regulation der Ovarientätigkeit liefern die Untersuchungen von LÜSCHER und ENGELMANN (35,52) an der Schabe *Leucophaea maderae*. Diese Schabe ist ovovivipar, d. h. die Eier werden in einer Sklerotinkapsel solange im Mutterkörper aufbewahrt, bis ihre Embryonalentwicklung nahezu abgeschlossen ist. Kurze Zeit nach der Ablage des Eipaketes schlüpfen die Larven aus.

Solange ein Eipaket in dem sogenannten "Uterus" der Tiere aufgehoben wird, produzieren die Ovarien keine neuen Eier. Diese Inhibierung wird durch einen stofflichen Faktor verursacht, der aus dem Eipaket - möglicherweise als Folge von Stoffwechselsvorgängen der sich entwickelnden Embryonen - abgegeben wird. Er ist hitzelabil und wirkt auf ein bestimmtes Zentrum im Protocerebrum, welches daraufhin die *C. allata* auf nervösem Wege hemmt.

Wird das Eipaket abgelegt oder operativ entfernt, so kommt es alsbald zu erneuter Aktivierung der *C. allata* und in deren Folge zur Ausbildung einer neuen Eigeneration. Wir haben hier also einen Fall der Rückwirkung von den weiblichen Geschlechtsorganen bzw. -produkten auf die *C. allata*.

Ähnliche Rückwirkungen können auch direkt von den Ovarien ausgehen. In Weibchen verschiedener Insektenarten, deren Ovarien-

aktivität unphysiologisch gestört ist (pathologischer, z B durch Hybridisation verursachter Funktionsausfall oder nach Kastration), kann es zu einer Hypertrophie der C. allata kommen (22,31,49,53,66,84). Die dafür verantwortlichen Faktoren wurden aber noch nicht analysiert.

Hypertrophie von Hormondrüsen infolge von Funktionsstörungen des Erfolgsorgans kennt man auch bei Wirbeltieren, und der Gedanke liegt nahe, daß es sich hier wie dort um Auswirkungen eines gestörten Rückkopplungsmechanismus' handelt.

Schlußfolgerung

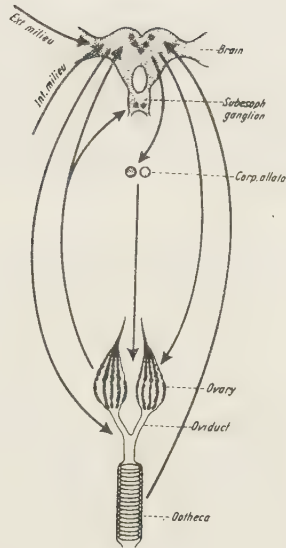
Das gesicherte Ergebnis der erwähnten und vieler anderer experimenteller Arbeiten ist: Die Ovarien der meisten Insektenarten sind in ihrer oft periodisch auftretenden Tätigkeit von entsprechenden Aktivitätsphasen der Corpora allata abhängig.

Diese werden ihrerseits durch ein nervös-humorales Koordinationssystem gesteuert, dessen zentrale Schaltstelle im Protocerebrum (wahrscheinlich in der Pars intercerebralis) liegt (s. Abb. 1).

Abb. 1:

Schema aller nachgewiesenen
und vermuteten Wege der
nervös-humoralen Regulation
der Eireifung bei Insekten

(aus: B. Scharrer,
Neuro-endocrine Mechanisms
in Insects,
Springer, 1958)



Physiologische Parallelen

Die übergeordnete Funktion der neurosekretorischen Zellen des Gehirns der Insekten und ihr enger Zusammenhang mit dem Corpus cardiacum-allatum-System finden ihre Parallele in den neurosekretorischen Zellen des Hypothalamus der Vertebraten und den verschiedenen Abschnitten der Hypophyse. In beiden Fällen haben die neurosekretorischen Zellen eine Schlüsselposition in der nervös-humoralen Regulation, und die "retrocerebralen" inkretorischen Organe sind Quellen für Hormone von übergeordneter Bedeutung und vielfältiger Wirkung (Wachstum, Blutdruck bzw. Herzfrequenz, Stoffwechselaktivität, reproduktive Funktionen). Der Vergleich läßt sich mit einigen Einschränkungen auch auf das X-Organ-Sinusdrüsen-System in den Augenstielen der Crustaceen ausdehnen, die eine ähnlich zentrale physiologische Bedeutung besitzen (73,85).

f) Wieviele Hormone produzieren die C. allata ?

Experimentelle Stützen für die Ein-Hormon-Theorie

Mit der Entdeckung der C. allata-Funktionen im Imaginalstadium mußte zwangsläufig die Frage auftauchen, ob dabei auch das Juvenilhormon wirksam ist, oder ob im erwachsenen Tier ein, möglicherweise mehrere andere Hormone gebildet werden.

Dieser Frage sind viele Autoren durch Transplantations- und Parabioseversuche nachgegangen. Dabei hat sich immer wieder gezeigt, daß die C. allata aus Larven die Funktionen der Adultorgane erfüllen können (22,84,86). Umgekehrt konnten durch C. allata aus erwachsenen Insekten Juvenilwirkungen in Nymphen, Puppen oder Imagines hervorgerufen werden (22,24,70,76,87-91).

Das scheint für eine Identität der C. allata-Inkrete in Jugend- und Adultstadien zu sprechen. Die Versuchsergebnisse lassen sich jedoch auch durch die Annahme erklären, daß die Drüsen sich nach Verpflanzung in ein anderes humorales Milieu verjüngen oder aber altern und sich dadurch der jeweiligen stadienspezifischen Funktion anpassen. Eine analoge Funktionsänderung ist bei Hauttransplantaten von Schmetterlingen gefunden und intensiv studiert worden (92), und auch die Ausbildung des Mitteldarms kann durch Verpflanzung in ein anderes Entwicklungsstadium verändert werden (93).

Experimentelle Stützen für die Mehr-Hormon-Theorie

Neuere experimentelle Befunde haben zu Zweifeln an der Identität der C. allata-Hormone geführt.

Erwachsene Larven (Pseudergaten) und Nymphen der Termiten Kaloterpes flavicollis reagieren auf C. allata-Transplantationen mit einer von zwei alternativen Differenzierungsmöglichkeiten: Entstammen die C. allata Pseudergaten, die kurz vor der Nymphenhäutung stehen, so wird die Entwicklung von Ersatzgeschlechtstieren begünstigt. Werden die C. allata dagegen aus irgendwelchen anderen Stadien oder Kasten entnommen (Nymphen, Soldaten, Geschlechtstiere u a), so bewirkt das Transplantat in den meisten Fällen die Differenzierung zu Vorsoldaten (29). Diese unterschiedliche Wirkung der C. allata verschiedener Spender führte LÜSCHER und SPRINGHETTI zu der Annahme mindestens zweier Hormone.

SÄGESSER (41) verglich den Sauerstoffverbrauch der Schabe Leucophaea maderae mit dem aufgrund der Morphogenese zu erwartenden

Juvenilhormonspiegel. Der Verlauf der Atmungsaktivität der beiden letzten Larvenstadien ist in Abbildung 2 dargestellt:

Auf einen während und kurz nach der Häutung auftretenden starken Anstieg folgen allmählicher Abfall bis zu einem Minimalwert, der ca 10 Tage vor der nächsten Häutung durchlaufen wird, und dann wieder erneute Zunahme. Das 7., zur Imaginalentwicklung überleitende Larvenstadium unterscheidet sich nicht grundsätzlich von den vorhergehenden.

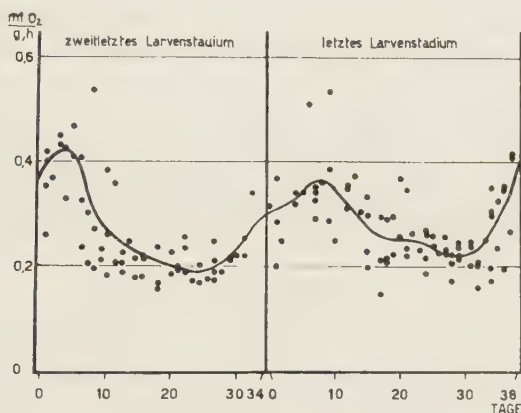


Abb. 2: Sauerstoffverbrauch von *Leucophaea maderae* im zweitletzten und letzten Larvenstadium (nach H. Sägesser, 1960)

Daraus schließt SÄGESSEER, daß es zwei verschiedene *C. allata*-Hormone gibt, deren eines, das Juvenilhormon, für die Morphogenese verantwortlich ist, während das andere die Atmungsaktivität reguliert. Letzteres hält er für identisch mit dem gonadotropen Hormon.

Isolierungsversuche

In den letzten Jahren wurde versucht, die Frage nach der Zahl und Natur der *C. allatum*-Hormone durch Extraktion und Anreicherung dieser Wirkstoffe zu klären. Als Ausgangsmaterial für die verschiedenen Isolierungsversuche wurden zunächst ganze Insektenkörper verschiedener Entwicklungsstadien verwandt.

Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß die männlichen Imagines eines amerikanischen Seidenspinners (Hyalophora cecropia) besonders reich an Juvenilhormonen sind (94). Sie haben sich bis heute als günstigster Rohstoff für Juvenilhormon-Präparationen erwiesen. Aber auch aus vielen anderen Insektenarten (95-97) und darüberhinaus aus Vertretern zahlreicher anderer Tierstämme (27, 98) konnten mehr oder weniger Juvenilhormon-aktive Extrakte gewonnen werden. Besonders überraschend ist es, daß auch Mikroorganismen und Pflanzen bzw pflanzliche Produkte Juvenilhormon enthalten (98-100).

Für diese Präparationen wurde das Ausgangsmaterial mit Fettlösungsmitteln (Äther, Athanol) extrahiert. Aus den Extrakten konnte dann durch Verdampfung des Lösungsmittels ein Öl gewonnen werden, das Juvenilhormon im Gemisch mit sämtlichen anderen Lipiden des Tierkörpers oder des pflanzlichen Rohstoffs enthielt. Durch geeignete präparative Verteilungsverfahren wurden und werden solche Rohextrakte aufgetrennt und gereinigt (95,101,102).

Modellsubstanzen mit C. allata-Hormonaktivität

Aus dem Kot von Tenebrio molitor konnten KARLSON und SCHMIALEK einen Juvenilhormon-wirksamen Extrakt gewinnen (103). SCHMIALEK identifizierte darin als hormonaktive Substanzen Farnesol, einen höheren, ungesättigten Terpenalkohol, und den entsprechenden Aldehyd Farnesal (100). Diese Verbindungen wurden an Tenebriopuppen auch dann als juvenil-positiv befunden, wenn sie aus Hefe isoliert worden oder synthetischen Ursprungs waren.

YAMAMOTO und JACOBSON konnten die Aktivität des Farnesols den Δ_6 -trans-Isomeren zuordnen (104). Außer an Tenebrio (Coleoptera) ist Farnesol auch an Rhodnius prolixus, Oncopeltus fasciatus, Cimex lectularius (Heteroptera) und Ephestia kühniella (Lepidoptera) juvenilwirksam (28). Daß es sich dabei um ein Hormon der C. allata handelt, ist allerdings nicht anzunehmen, da Farnesol zu geringe humorale Wirksamkeit und zu hohe Toxizität besitzt (102).

Wege zur Klärung

Für die sichere Beantwortung der Frage nach der Identität oder Verschiedenheit der an der Jugend- bzw Eientwicklung beteilig-

ten *C. allata*-Hormone muß man geeignete Extrakte fraktionieren und die Fraktionen auf ihre Aktivität hinsichtlich der beiden Hormonwirkungen prüfen. Findet man bei einer solchen Untersuchung Übereinstimmung der Aktivitäten über viele Reinigungsschritte, so spricht das für die Identität der Hormone. Weichen dagegen bei einer Auftrennung die Maxima der beiden Aktivitäten voneinander ab, so spricht das für die Beteiligung verschiedener Hormone.

Die Voraussetzung einer solchen Arbeit ist, daß möglichst spezifische, für Serienversuche geeignete Testmethoden zur Verfügung stehen. Für das Juvenilhormon gibt es eine Anzahl solcher Methoden. Von verschiedenen Arbeitskreisen wurden die nach *C. allata*-Transplantationen beobachteten morphogenetischen Wirkungen zu einem quantitativen Testverfahren verfeinert (102,105,106). Zur Prüfung der ovarienstimulierenden Wirkung fehlte bislang ein solches.

II. ZIEL DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, einen geeigneten Test auf das vitellogene (gonadotrope) Hormon der Insekten zu entwickeln. Dafür bot die Arbeit von LARSEN und BODENSTEIN (70) einen Ausgangspunkt. Die Autoren konnten durch Injektion von Insekten-Lipidextrakten in anautogene Stechmückenweibchen (*Aedes aegypti* und *Culex pipiens*) Ovarienreifung auslösen, ohne daß diese mit Blut gefüttert wurden. (Sie sahen darin allerdings - ausgehend von der Annahme der Identität der *C. allata*-Hormone - die Möglichkeit für einen Test auf Juvenilhormon). Dieser Befund schien eine günstige Voraussetzung für den gesuchten Test, da man die Wirkung eines Inkretes prüfen konnte, ohne vorher das zugehörige inkretorische Organ ausschalten zu müssen. Eine zweimalige Operation (Allatektomie oder Decapitation und Injektion) ist für einen routinemäßig anzuwendenden Test ein großer Nachteil und sollte deshalb nach Möglichkeit umgangen werden.

Die ersten Versuche wurden an *Aedes aegypti* durchgeführt, später wurden sie auch auf *Calliphora erythrocephala* ausgedehnt.

Ein anderer Teil der Arbeit galt der Frage, ob sich bei *Aedes* eine Beziehung zwischen der Ovarreifung und der Atmungsaktivität finden läßt. Es sollte geklärt werden, ob die für die Dotterbildung nötige C. allata-Hormonproduktion zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch führt.

III. MATERIAL UND METHODEN

Aufzucht und Haltung von *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae)

Die Tiere entstammen einer Zucht aus dem Wuppertaler Laboratorium der Fa. Farbenwerke Bayer AG. Die Gelege wurden in abgestandenem Wasser (etwa gleiche Teile Leitungs- und destillierten Wassers) von 27°C. angesetzt und die Larven mit gemahlenem Mäusekuchen und "Tetra Min"-Zierfischfutter (1:1) gefüttert. Jeweils 30 - 50 Puppen wurden mit frischem Wasser in Standgläser überführt. Als "Käfige" für die Mücken dienten auf die Gläser aufgesetzte Lampenzylinder, deren obere Öffnung mit Verbandmull verschlossen war. Nach dem Ausschlüpfen der Imagines wurden die Wassergläser durch passende, mit feuchtem Filterierpapier ausgeschlagene Petrischalen ersetzt.

Die sog. "Hungerweibchen" erhielten an jedem 2. Tag eine frische Apfelscheibe. Die für Decapitationsversuche bestimmten Weibchen wurden bis zum Versuchsbeginn ohne jede Nahrung gehalten. Durch diese Vorbehandlung erreicht man, daß die Tiere sehr rasch anbeißen, sobald ihnen eine geeignete Nahrungsquelle geboten wird, und damit einen ziemlich einheitlichen Versuchsbeginn (Zeitintervall: ca 5 Minuten). Außerdem sollen dadurch größere individuelle Differenzen in der Zeitspanne zwischen Blutaufnahme und Hormonproduktion bzw -ausschüttung vermieden werden (60, 72).

Die *Aedes*weibchen wurden mit menschlichem Blut gefüttert, gewöhnlich durch Anlegen eines Zuchtgefäßes an den Arm des Experimentators. Vor und nach Fütterung bzw Operation wurden sie im Brutschrank bei ca 28° C. und etwa 90 % rel. Luftfeuchtigkeit gehalten.

Decapitation von Aedes aegypti

Die Tiere wurden nach einer kurzzeitigen Kohlendioxyd-Betäubung einzeln in 10ml-Erlenmeyer Kölbchen gelegt und unmittelbar vor der Operation durch Kühlung in einem Eiswasserbad anästhetisiert. Der Kopf wurde mit einer Schlinge aus feinem Perlongarn abgeschnürt wobei die im Thorax liegenden Corpora allata unverletzt blieben. Nach dieser Behandlung trat kein nennenswerter Hämolymphverlust ein, auf den von anderen Autoren verwandten Wundverschluß durch Praffin konnte deshalb verzichtet werden. Die decapitierten Mücken wurden in Petrischalen aufgehoben, deren Boden mit feuchtem Filtrierpapier bedeckt war.

Für wertvolle Anregungen hinsichtlich der Aufzucht und Behandlung von Aedes bin ich Herrn Dr. A.O. Lea, Entomological Res. Center, Florida State Board of Health, zu großem Dank verpflichtet.

Aufzucht und Haltung von Calliphora erythrocephala Meig. (Diptera, Calliphoridae)

Die Fliegen stammten aus einer Massenzucht unseres Institutes, die aus einer Subkultur des im Zoologischen Institut der Universität München seit Jahren gehaltenen Stammes aufgebaut worden war. Die Larven wurden bei normaler Raumtemperatur (20 - 23°C.) mit Freibankfleisch aufgezogen. Nach dem Ablaufen vom Fleisch wurden die Tiere zwischen Sägemehl in mit feiner Metallgaze verschlossenen Gläsern aufbewahrt, um Befall von Schlupfwespen zu vermeiden.

Für die verschiedenen Versuche wurden jeweils 20 - 30 frisch geschlüpfte Fliegen in Lampenzylindern bei einer Raumtemperatur von 20 - 23°C. gehalten und entweder nur mit Wasser und Zucker ("Zuckerfliegen") oder zusätzlich mit einem aus Trockenhefe und Milch angerührten Brei (als Eiweißquelle) versorgt.

Injektionen

Für die Injektionen wurde eine von der Zentralwerkstätte Göttingen angefertigte Mikroinjektionsspritze nach BERGOLD

(107) verwandt, in Kombination mit einer auf etwa 0,07 mm äußerem Durchmesser ausgezogenen Glaskapillare. Zur Halterung der Spritze diente ein in der Werkstatt des Max Planck-Instituts für Biochemie, München, gebauter einfacher Mikromanipulator, der fest mit dem Zeiß Stereo-Mikroskop II verbunden werden konnte.

Versuchs- und Kontrolltiere wurden stets der gleichen Aufzucht entnommen.

Injektionen bei Aedes

Aedesweibchen lassen sich am besten nach Kohlendioxyd-Betäubung operieren. Dazu wurde für einige Minuten ein schwacher Gasstrom durch die obere Öffnung der Glaszylinder eingeblasen. In Versuchen mit größeren Tierzahlen wurde diese Narkose mit einer Kältebehandlung kombiniert (vergl Decapitationsversuche), um eine längere CO₂-Einwirkung zu vermeiden.

a) Injektionen in den Thorax

Den in einem kleinen Wachsbecken liegenden Tieren wurde die Kanüle durch die hinter der Flügelansatzstelle gelegene Interpleuralhaut (zwischen Meso- und Metathorax) schräg von hinten eingestochen und die Flüssigkeit in die Thoraxmuskulatur injiziert.

b) Injektionen in das Abdomen

Hierbei erfolgte der Einstich von hinten durch die laterale Flankenhaut zwischen dem 5. und 6. Abdominalsegment und die Kanüle wurde etwa um die Länge eines Segmentes vorgeschoben.

c) Injektionen an ein Ovarium

Bei dieser Methode wurde die Kanüle zwischen dem 6. und 7. Abdominalsegment eingestochen und der Extrakt an das linke der im 6. Segment liegenden Ovarien gespritzt.

d) Injektionen in den Femur

Den Tieren wurde ein Mittelbein in der Höhe des Femur abgeschnitten und die Flüssigkeit in den Beinstummel injiziert. Infolge eines durch den Hämolymphestrom erzeugten leichten Soges wird das zunächst hervorquellende Flüssigkeitströpfchen innerhalb 1/2 - 1 Minute in das Tier hineingepumpt. Diese Methode erwies sich als besonders schonend.

Injektionen bei Calliphora

Die sehr viel robusteren Calliphoraweibchen erlitten durch Abdominalinjektionen keine nachweisbare Schädigung. Es konnte deshalb bei allen Versuchen in die abdominale Leibeshöhle injiziert werden. Die Kanüle wurde dazu ventrolateral durch die Intersegmentalhaut zwischen dem 3. und 4. Abdominalsegment von hinten eingestochen.

Während Aedes sehr rasch auf Kohlendioxyd anspricht, bedarf es zur vollständigen Betäubung von Calliphora unter sonst gleichen Bedingungen einer 10 - 20 Minuten dauernden Einwirkung. Äther wirkt demgegenüber rasch, und die Narkose hält genügend lange an, um injizieren zu können. Die oberen Öffnungen der Glaszylinder wurden mit Filtrierpapierblättchen bedeckt und auf diese einige Tropfen Äther geträufelt.

Um den Einfluß der Betäubungsmittel auf die Ovarienentwicklung festzustellen wurden Tiere der gleichen Zucht und des gleichen Alters während einer Ovulation mit einem der beiden Narkotika behandelt und nach einigen Tagen der Reifungsgrad verglichen. Wie die Tabelle 2 zeigt, bleibt die Oocytenentwicklung in den Kohlendioxyd-behandelten Tieren beträchtlich gegenüber den Kontrolltieren zurück, während die Äthernarkose keinen hemmenden Einfluß ausübt.

Für die Versuche an Calliphora wurde deshalb generell Äther als Betäubungsmittel verwandt.

Tabelle 2: Einfluß von Betäubungsmitteln auf die Ovarienentwicklung von Calliphora

Behandlung	"Fraßzeit") ₁ Tg.		Anzahl Vers.-t.	-	E r g e b n i s		
	a	b			beg.	+	Ø Reifg.- erf.) ₂
keine	-	6 1/2	31	3	6	22	46
15 Min.CO ₂	3	6 1/2	23	7	4	12	27
5 Min.Äther	3	6 1/2	25	1	6	18	50

)₁ Zeitintervall zwischen Beginn der Proteinaufnahme und
a) Narkotisierung bzw b) Tötung

-)₂ mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren.

Injizierte Präparate

Folgende Extrakte stammten aus anderen Arbeitsgruppen des Physiologisch-Chemischen Institutes (u.a. entspr. 102):

1. das rohe Bombyx-Puppenöl (Gemisch der durch Methanol aus *B. mori* extrahierbaren Lipide),
2. Aceton-Nachextrakt aus bereits mit Methanol extrahierten Bombyxpuppen,
3. Fraktion einer Chromatographie des Bombyx-Puppenöls an Aluminiumoxyd,
4. Bombyxkopföl (die ölige Fraktion eines Methanolextrakts aus den Köpfen der Falter).

Die Extrakte aus *Leucophaea maderae* wurden in Anlehnung an WILLIAMS (94) auf folgende Weise hergestellt (das Tiermaterial stellte uns freundlicherweise Herr Prof. Dr. M. Lüscher, Zoologisches Institut der Universität Bern, zur Verfügung):

Die in Methanol konservierten Schaben wurden im Starmix mit Äther-Äthanol (2:1) ca 5 Min. homogenisiert und das Homogenat filtriert. Der Filtrerrückstand wurde zweimal mit denselben Lösungsmitteln nachextrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden unter Wasserstrahlvakuum auf dem Dampfbad eingeengt, die öligen Rückstände im Vakuum-Exsikkator über Kalziumchlorid von Lösungsmittelresten befreit und 15 Min. bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Es schied sich ein hellbrauner Niederschlag ab, dessen relative Menge bei den einzelnen Extrakten verschieden war. Die überstehenden klaren Öle wurden abdekantiert und bis zu ihrer Verwendung im Kühlraum bei ca - 5°C. aufbewahrt.

Das Präparat aus *Hyalophora cecropia* wurde uns freundlicherweise von Dr. L. I. Gilbert, Dptm. of Biological Sciences, Northwestern University, Evanston, Illinois, überlassen.

Die Extrakte wurden zum Teil mit handelsüblichem Olivenöl verdünnt. Dasselbe diente auch für Kontrollinjektionen.

Von Farnesol wurden die Handelspräparate der Firmen Hoffmann-La Roche (Ro-2-8781) und Carl Roth, Karlsruhe (PUR) verwandt. Proben von Cyclohexylammonium-natrium-farnesylphosphat und Trilithium-farnesyl-pyrophosphat überließ uns freundlicherweise Herr Dr. Kirschner, Max Planck Institut für Zellchemie, München, Farnesylmethyläther und Farnesyldiäthylamin verdanken wir Herrn Dr. O. Wiss, Fa Hoffmann-La Roche, Grenzach.

Lösungen und Emulsionen wurden mit der von EPHRUSSI und BEADLE (108) empfohlenen physiologischen Salzlösung ("Ringerlösung") bereitet:

7,5 g Natriumchlorid, 0,35 g Kaliumchlorid und 0,21 g Kalziumchlorid pro Liter. Um die schwerlöslichen Farnesylphosphate optimal in Lösung zu bringen, wurde eine Kalzium-freie Modifikation dieser Ringerlösung verwandt.

Zur Stabilisierung der Öl-Wasser- oder Farnesol-Wasser-Emulsionen erwiesen sich die unter dem Namen Tween bekannten Detergentien (bezogen von der Fa Dr. Theodor Schuchardt, München) als recht geeignet. Für unsere Versuche wurde Tween 40 (Polyoxyäthylen-sorbitan-monopalmitat) verwandt. Es gewährleistet in einer Konzentration von 2 - 3 % beständige Emulsionen aus ungefähr gleichen Gewichtsanteilen von Öl und Wasser. 10%ige Farnesolemulsionen konnten durch 1 % Tween 40 haltbarer gemacht werden. Für stärker verdünnte Emulsionen des Farnesols oder seiner Derivate erübrigte sich Emulgatorzusatz. Die eingewogenen Gemische wurden durch Ultraschall (SIEMENS-Beschallgerät) oder in einem Glashomogenisator nach Potter homogenisiert).

Tötung, Fixierung, Auswertung

Nach der gewünschten Versuchsdauer wurden die Tiere mit Ather getötet und in dem von WEAVER und THOMAS (109) angegebenen Gemisch fixiert (5 ml 40%ige Formaldehydls., 2,5 ml Eisessig und 20 g Chloralhydrat pro 100 ml Fixierlösung). Die Fixierung ist für die Präparation zwar nicht unbedingt erforderlich, erleichtert jedoch die Isolierung und Messung der Ovarien. Außerdem bietet sie den Vorteil, daß die Auswertung größerer Versuchsserien nicht zeitlich begrenzt ist.

Kriterium für Erfolg oder Mißerfolg der Behandlung war stets das Stadium der Ovarentwicklung in den Versuchstieren. Als Maß dafür wurde mit Hilfe eines Zeiß Stereo-Mikroskops II in Kombination mit einem Okularmikrometer die Länge der Eifollikel gemessen.

Bei Calliphora wurden die gefundenen Reifungsstadien in drei willkürlich begrenzte Kategorien eingeteilt:

1. keine sichtbaren Anhaltspunkte für eine Ovarentwicklung: Ovardurchmesser 0,8 - 1,2 mm, durchschnittliche Follikellänge unter 0,1 mm (-);
2. beginnende Oocytenreifung: die Länge der Follikel beträgt 0,1 - 0,2 mm, der Dottergehalt ist minimal (beg.);
3. die Oocyten haben nachweisbare Mengen Dotter eingelagert, und die Follikel haben die Länge von 0,2 mm überschritten (+).

Als ein gut vergleichbares Maß für das Stadium der Ovarentwicklung erwies sich der "durchschnittliche Reifungserfolg". Als solcher wird der Durchschnitt aller erreichten Follikellängen definiert, ausgedrückt in Prozent der Länge reifer Eifollikel. Dabei werden nur dotterhaltige Oocyten ausgewertet, d h solche der 3. oben beschriebenen Kategorie.

Bestimmung der Juvenilhormon-Aktivität

Die Juvenilhormon-Aktivität der verschiedenen Extrakte und Wirkstoffe wurde im Tenebrio-Test von KARLSON und NACHTIGALL (102) bestimmt. Es werden in Puppen des Mehlkäfers je 0,5 ul des (verdünnten) Extraktes oder der Wirkstofflösung in Olivenöl subcutan unter das 4. Abdominalsternit injiziert. Bei einer positiven Reaktion erscheint nach der Imaginalhäutung am Depositionsort ein Flecken weißer, pupaler Cuticula.

Als eine Tenebrio-Einheit (T.E.) des Hormons ist diejenige Menge wirksamer Substanz definiert, die bei 30 - 50 % der Versuchstiere eine solche epidermale Determinationsänderung hervorruft.

Atmungsmessungen an Aedes

Die Messungen wurden in einem Warburg-Apparat bei 20°C. durchgeführt. Die Einsätze der etwa 15 ml fassenden Atmungsströge enthielten 0,2 ml 30%ige Kalilauge und zur Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche einen zusammengerollten Filtrierpapierstreifen. Das Ganze wurde mit einem Deckelchen aus Drahtgaze bedeckt. Um eine möglichst hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen, wurden in den Seitenarm 0,3 ml Wasser gefüllt. Die Manometer enthielten Brodie'sche Lösung als Sperrflüssigkeit.

In jedem der nicht bewegten Atmungsgefäße befanden sich etwa 5 Versuchstiere. In Abständen von 30 - 60 Minuten wurden die Druckdifferenzen registriert und gegen den äußeren Luftdruck ausgeglichen.

IV. a) Versuche zur Frage der vitellogenen Aktivität der Corpora allata (bzw von analog wirkenden Stoffen):

1. Normalverlauf der Ovarienentwicklung und kritische Periode bei Aedes aegypti

Normalverlauf der Ovarentwicklung nach Blutfütterung

Um den normalen Entwicklungsablauf der Ovarien in dem von uns verwandten Stamm der Aedes aegypti zu studieren, wurde eine Anzahl von Weibchen zu verschiedenen Zeiten nach Aufnahme der Blutmahlzeit getötet, fixiert und im Hinblick auf das Stadium ihrer Ovarentwicklung untersucht. Als Maß dafür wurde die durchschnittliche Länge der Eifollikel unter dem Mikroskop gemessen. Das Ergebnis dieser Versuchsserie ist in Abbildung 3 dargestellt.

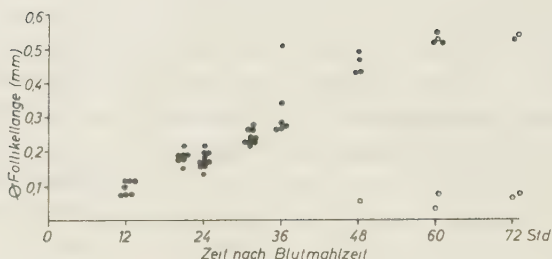


Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Ovarienentwicklung von *A. aegypti* nach einer Blutmahlzeit

Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier, die durch Kreise markierten hatten ihre Eier schon (teilweise) abgelegt.

In ungefütterten Weibchen sind die Ovarien sehr kompakt. Die Oocyten liegen dicht beieinander, und ihre Begrenzung ist nur schwer zu erkennen. Ihre durchschnittliche Länge schwankt um 0,05 mm. Dies ist das Diapausestadium, in dem die Ovarien verharren, solange die Tiere keine Blutmahlzeit bekommen. Etwa 12 Stunden nach einer Blutmahlzeit werden die ersten äußeren Veränderungen sichtbar. Nach 24 Stunden haben die Oocyten die Länge von 0,1 mm überschritten und damit das Stadium erreicht, in dem der Dotter eingelagert wird. Bereits 48 Stunden nach der Fütterung haben einige Weibchen ihre Eier bis zur Lege-reife entwickelt, nach 72 Stunden sind fast alle zur Ablage bereit.

Kritische Periode für die Decapitation nach Blutfütterung

Zwischen dem Stimulus der Blutmahlzeit und der Aktivierung der *C. allata* durch das Gehirn verstreicht eine gewisse Zeit. Entfernt man den Kopf mit seinen aktivierenden Zentren vorher,

so bleibt die Ovarreifung aus, obwohl die *C. allata* im Tier verbleiben. Die mehr oder weniger lange Übergangszeit zwischen den Extremen wird die üblich als "kritische Periode" bezeichnet.

Sie wird für *A. aegypti* von LARSEN und BODENSTEIN (70) mit 30 bis 50 Minuten, von GILLETT (68,69) mit 4 bis 8 Stunden angegeben. Es ist möglich, daß diese Differenz nicht nur durch Unterschiede in der Tierhaltung und Operationstechnik, sondern auch durch solche im Tiermaterial bedingt ist.

In einer Reihe von Schnürungsexperimenten sollte die kritische Periode des von uns verwandten Stammes der *A. aegypti* bestimmt werden. 2 bis 5 (meist 2) Tage alte Weibchen wurden in folgenden Zeitintervallen nach der Blutfütterung decapitiert: 10 - 15, 60 - 90, 115 - 140, 180 - 200, 210 - 240, 240 - 280 und 280 - 300 Minuten.

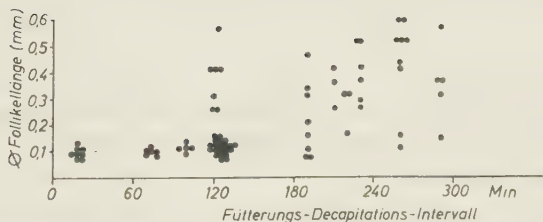


Abb. 4: Ovarreifung decapitierter *A. aegypti*-Weibchen in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Blutmahlzeit und Decapitation

Die Tiere wurden 48 Stunden nach der Fütterung getötet. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier.

Die in Abbildung 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß 4

bis 5 Stunden nach der Blutaufnahme die aktivierende Wirkung des Gehirns entbehrlich wird, d h, der Prozentsatz der Tiere mit unreif bleibenden Ovarien nimmt ab. Die Ovarien der entsprechenden Versuchstiere sind aber sehr ungleichmäßig entwickelt und im Vergleich zu den Ovarien vergleichbarer intakter Tiere zurückgeblieben (vergl. Abb. 3).

Die nach nur 48-stündiger Inkubation gefundenen Reifungsstadien entsprechen sicher nicht den optimal erreichbaren. Möglicherweise brauchen die nur partiell aktivierten *C. allata* längere Zeit für die Produktion einer ausreichenden Menge des vitellogenen Hormons oder die Oocyten wachsen infolge des niedrigeren Hormonspiegels langsamer heran.

Die Decapitation innerhalb von 2 Stunden nach dem Blutsaugen verhindert die Dottereinlagerung völlig. Die Oocyten sind aber dennoch gegenüber denen ungefütterter Weibchen deutlich verändert. Sie erreichen das Stadium, welches in der normalen Entwicklung nach 12 Stunden eintritt. Dieses erste schwache Wachstum der Oocyten erfolgt wahrscheinlich unter Verbrauch der Nährzellreserven, für die Dotterproduktion müssen aber die Epithelzellen der Follikel hormonal aktiviert werden. Diese Befunde stehen qualitativ in Übereinstimmung sowohl mit LARSEN (70) als auch mit GILLETT (72), die kritische Periode entspricht der von GILLETT angegebenen.

2. Versuche zur experimentellen Induktion der Ovarentwicklung von Aedes durch Injektion von Insekten-Lipidextrakten

Zunächst sollte geprüft werden, ob bei Aedesweibchen, die überhaupt keine Blutmahlzeit erhielten ("Hungerweibchen"), durch *C. allata*-Hormon eine Eireifung induziert werden kann. Hierzu wurden Extrakte möglichst hoher Juvenilhormon-Aktivität ausgewählt und mit verschiedener Technik injiziert.

Injektionen in den Thorax von Hungerweibchen

Bei den ersten Versuchen wurde die Substanz nach Kohlendioxyd-Narkose in den Thorax der Mücken injiziert. Das schien wegen der großen mechanischen Stabilität und der

großen Masse der im Thorax enthaltenen Muskulatur zweckmäßig. Die Verletzung oder Schädigung lebenswichtiger Organe sollte dadurch vermieden werden. Die Mehrzahl der Tiere überlebte diesen Eingriff (Blindinjektion von Ringerlsg.) lange genug, um eine eventuelle Hormonwirkung beobachten zu können. Sie zeigten auch in ihrer Beweglichkeit keine bemerkenswerten Abweichungen von unbehandelten Tieren.

Nach dieser Methode wurden folgende Roh- bzw aufbereitete Extrakte geprüft: 1. rohes Bombyx-Puppenöl (durch Methanol extrahierbare Lipide aus B.mori), 2. Acetonextrakt aus Bombyxpuppen und 3. die aktivste Fraktion einer Chromatographie des Puppenöls an Aluminiumoxyd (1:8 mit Olivenöl verdünnt).

Injiziert wurde am 3. bis 6. Lebenstag. Die Inkubationszeiten wurden länger gewählt, als für die normale Eireifung nötig ist, um auch bei langsamer Resorption der Extrakte noch eine Wirkung erkennen zu können. Die Bedingungen der Versuche und ihre Ergebnisse sind in Tabelle 3a zusammengestellt.

Wurden mehr als 0,05 µl der Öle injiziert, so starben die meisten der Versuchstiere. Anzeichen einer Ovarienaktivität waren in keinem Falle zu finden. Bei der Präparation fand sich häufig das Öl als kompakter Tropfen zwischen der Thoraxmuskulatur, ein Zeichen dafür, daß es nicht resorbiert worden war. Es erschien daher ratsam, eine andere Injektionsmethode zu verwenden.

Tab. 3a: Wirkung der Injektion von Insekten-Lipidextrakten auf die Ovarienentwicklung von Aedes-Hungerweibchen

Art des Extraktes	Juvenil- aktiv.) ₁	Inj. Menge μl	Inkub- zeit Tg.	Anzahl beh. überlbd Tiere		Sterbl %	Ergebnis) ₂	
							-	+
		"Thorakal-Injektionen"						
1) Bombyx-Puppen- öl, roh	40-50	0,04- 0,06	7	21	7	67	7	0
2) Bombyx-Aceton- extrakt	42	0,025 -0,05	6-7	31	6	81	6	0
3) Fraktion der Chromatographie (1:8 m. Oliven- öl verdünnt)	53	0,05	7	25	1	96	1	0
		"Abdominal - Injektionen"						
4) Bombyx-Aceton- extrakt	42	0,03 0,05	7 7	13 27	10 15	23 44	10 15	0 0
5) Fraktion der Chromatographie (1:8 m. Oliven- öl verdünnt)	53	0,03	7	23	15	35	15	0

)₁ im Tenebrio-Test: Die Zahlen geben den Prozentsatz der Tiere an, die nach Injektion von 0,5 μ l eine positive epidermale Reaktion zeigten.

)₂ Anzahl der Tiere mit (-) unreifen oder (+) reifenden Ovarien

Injektionen in das Abdomen von Hungerweibchen

In den folgenden Versuchen wurden die Extrakte 1 - 4 Tage alten Weibchen in das Abdomen injiziert, also in die unmittelbare Nähe des Wirkungsortes. Die Ovarien blieben dabei unverletzt, kamen aber mit dem Extrakt nicht in direkte Berührung. Die Versuchstiere wurden durch diese Art der Injektion weniger geschädigt als durch die vorher beschriebene. Bei gleicher Art und Menge des applizierten Extraktes trat eine geringere Sterblichkeit auf (s. Tab. 3a). Auch bei diesen Versuchen zeigten die Ovarien keinerlei Reaktion auf die injizierten Wirkstoffe. Dabei ist schwer zu entscheiden, ob dies an der fehlenden gonadotropen Aktivität der Öle oder an der ungenügenden Verteilung der aktiven Komponenten in der Leibeshöhle der Tiere lag. Das injizierte Öl wurde auch hier bei der Präparation als kompakter Tropfen wiedergefunden.

Um Transportschwierigkeiten als mögliche Ursache für den Mißerfolg endgültig auszuschließen, sollten in einer weiteren Reihe von Versuchen die zu injizierenden Extrakte in unmittelbare Berührung mit den Ovarien als reagierende Gewebe gebracht werden. Damit wurde eine ähnliche Versuchsanordnung angestrebt wie beim *Tenebrio-Juvenilttest* (KARLSON und NACHTIGALL, 1952), in dem die Extrakte gute Wirkung gezeigt hatten.

Juvenilhormon-Gehalt von *Leucophaea maderae* Fabr.

Aus verschiedenen Stadien von *L. maderae* wurden durch Äther-Äthanol-Extraktionen Öle gewonnen, und im *Tenebrio-Juvenilhormontest* auf ihre Wirkung geprüft. Die folgende Zusammenstellung gibt den Prozentsatz der Tiere an, die nach Injektion von 0,5 µl eine juvenil-positive epidermale Reaktion zeigten:

a) Extrakt aus Larven	C,
b) Extrakt aus trächtigen Weibchen	45 - 49,
c) Extrakt aus nicht tr. Weibchen	24 - 34,
d) Extrakt aus Männchen	21 - 24.

Zwei Test wurden im Ab-

stand von etwa 1 Jahr durchgeführt. Die Werte differieren zwar etwas, aber das Aktivitätsverhältnis der verschiedenen Extrakte stimmt in beiden Versuchen gut überein.

Das Ergebnis ist in verschiedener Hinsicht überraschend. Zunächst würde man erwarten, daß die Larven (es handelte sich dabei um solche sehr verschiedenen Alters) den höchsten Gehalt an Juvenilhormon zeigen. Stattdessen ließ sich in dem aus ihnen gewonnenen Extrakt gar keine Juvenilwirkung nachweisen. Wollte man die Juvenilaktivität aber mit der zu erwartenden Menge an gonadotropem Hormon gleich- oder parallelsetzen, so wäre nach ENGELMANN (52) zu erwarten, daß sich aus trächtigen Weibchen, bei denen die Corpora allata-Funktionen vorübergehend gehemmt sind, weniger Hormon extrahieren läßt als aus nicht trächtigen Tieren. Das Gegenteil ist der Fall: der Extrakt aus trächtigen Weibchen bewirkte bei einem etwa doppelt so großen Prozentsatz behandelter Tiere einen positiven Effekt wie der aus nicht trächtigen, d h es ist in jenem mit einem mehr als doppelt so hohen Hormongehalt zu rechnen.

Injektionen an die Ovarien von Hungerweibchen

Mit dieser Methode wurden das rohe Bombyx-Puppenöl, und die beiden im Juvenilttest aktivsten der aus Leucophaea gewonnenen Extrakte geprüft, und zwar teils unverändert als Öle, teils in Form wässriger Emulsionen mit Tween-Zusatz. In beiden Fällen wurden die gleichen Extraktmengen zugeführt, von der 1:1-Emulsion das doppelte Volumen wie vom reinen Öl.

Getrennte Versuche hatten ergeben, daß Tween 40 auch in höherer als der für die Emulsionen erforderlichen Konzentration (Injektion von 0,05 µl 10%iger wässriger Lösung) weder einen fördernden Einfluß auf die Ovarentwicklung in Hungerweibchen noch einen hemmenden auf die Oocytenreifung blutgefütterter Tiere hat.

Die Versuche wurden an 1 - 3 Tage alten Weibchen durchgeführt. Die übrigen Einzelheiten gibt die Tab. 3b wieder. Auch nach dieser Art der Applikation fanden sich keine

Anzeichen für eine Ovarienaktivierung, zwischen dem Ovarium auf der Seite der Injektion und dem anderen war kein Unterschied festzustellen.

Tab. 3 b: Wirkung der Injektion von Insekten-Lipidextrakten auf die Ovarienentwicklung von Aedes-Hungerweibchen

Des Extraktes	Juvenil- aktiv.) ₁	Inj. Menge µl	Inkub. zeit Tg	Anzahl beh.überlbd Tiere		Sterbl %	Ergebnis) ₂	
							-	+
"Ovarialinjektionen"								
Bombyx-Puppen- öl, roh (1:1 m. aqu. dest. vermischt 3 % Tween 40)		0,05	4-5	18	13	28	13	0
Extrakt aus trächtigen Leucophaea-oo ++	45	0,03	4-5	17	16	(6)	16	0
ito (1:1 m. aqu. dest.vermischt, 2,2% Tween 40)		0,06	4-5	17	15	(12)	15	0
Extrakt aus nicht tr. Leu- cophaea-oo ++	24	0,03	7	16	8	50	8	0
ito (1:1 m. aqu. dest.vermischt, 2 % Tween 40)		0,06	7	11	7	36	7	0

)₁ im Tenebrio-Test: Die Zahlen geben den Prozentsatz der Tiere an, die nach Injektion von 0,5 µl eine positive epidermale Reaktion zeigten.

)₂ Anzahl der Tiere mit (-) unreifen (Diapause-) oder (+) reifenden Ovarien

3. Injektionen von Farnesol oder Farnesyldiäthylamin in Aedes-Weibchen

Nachdem SCHMIALEK 1961 (100) gefunden hatte, "daß Farnesol und Farnesal für die Juvenilwirkung von Extrakten aus Hefe und Mehlwurmkot ganz oder teilweise verantwortlich sind", und WIGGLESWORTH (28) diese Stoffe an *Rhodnius* sowohl hinsichtlich ihrer juvenilen als auch einer daraufhin vermuteten "dotterbildenden" Wirkung als positiv befunden hatte, war es von Interesse, Farnesol auch an *Aedes* auf eine eventuelle vitellogene Wirkung zu testen.

Aedes-Weibchen wurden im Alter von 2 bis 6 Tagen mit verschiedenen Dosen von Farnesol behandelt, daß in Olivenöl gelöst oder unter Zusatz von Tween 40 in Insekten-Ringerlösung emulgiert worden war.

Injektionen von Farnesol in das Abdomen von Hungertieren

Bei den ersten Versuchen wurde in der früher beschriebenen Weise unter Schonung der Ovarien in das Abdomen (4.-5.Segment) injiziert, diesmal nach kombinierter Kohlendioxyd-Kälte-Betäubung. Farnesol bewirkte in Dosen von 0,5 - 5 μ g/Tier eine sehr hohe Sterblichkeit (25 - 70 %), eine Veränderung der Ovarien konnte in keinem Falle beobachtet werden (s. Tab. 4).

Injektionen von Farnesol in den Femurstumpf von Hungertieren

Die Sterblichkeit der Versuchstiere ließ sich durch eine andere schonendere Injektionstechnik beträchtlich herabsetzen. Den Tieren wurde ein Bein am Oberschenkel abgeschnitten und die Flüssigkeit in den Femurstumpf eingespritzt. Auch bei diesen Versuchen wurden innerhalb einer zweitägigen Inkubationszeit nach Injektion von 5 μ g Farnesol die Ovarien nicht aktiv (Tab. 4).

Die hohe Sterblichkeit bei den geschilderten Experimenten legte die Vermutung nahe, daß eine mögliche Hormonaktivität des Farnesols durch Überdosierung und dadurch bedingtes Überwiegen eines toxischen Effektes unterdrückt würde. (Die Injektion von 10 μ g emulgierten Farnesols wirkt innerhalb weniger Stunden tödlich auf die behandelten Tiere.) Eine Anzahl von *Aedes*-Weibchen erhielten deshalb Dosen von Farnesol,

die um eine Zehnerpotenz unter den bisher injizierten Minimalmengen lagen. In einem Versuch wurde einmal, in einem anderen zweimal im Abstand von 24 Stunden in den Femurstumpf injiziert. Die Tiere wurden am 2. Tag nach dem 1. Eingriff getötet und fixiert. Die Ovarien blieben jedoch auch nach dieser Behandlung unentwickelt (Tab. 4).

Tab. 4: Wirkung von Farnesolinjektionen auf die Ovarienentwicklung von Aedes-Hungerweibchen

Innervation	Juvenil- aktiv.), ₁	Inj. Vol. µl	Inj. Menge µg	Inkub. zeit Tg	Anzahl beh. Überlbd Tiere		Sterbl %	Ergebnis - +	
		Abdominalinjektionen							
:100 in livenöl	5-15	0,05	0,5	2	24	18	25	18	0
:10 in livenöl	30-65	0,05	5	2	17	5	70	5	0
:10 in ingerlsg .1 % ween 40		0,03 -0,03	3-5	2	25	14	44	14	0
		Injektionen in den Femurstumpf							
:10 in ingerlsg .1 % ween 40		0,05	5	2	13	12	(8)	12	0
:200 in ingerlsg		0,01	0,05	2	26	26	0	26	0
to		0,01		2	24				
	1 Tag danach:	+0,02	0,15	(1)		24	0	24	0

)₁ im Tenebrio-Test: Die Zahlen geben den Prozentsatz der Tiere an, die nach Injektion von 0,5 µl eine positive epidermale Reaktion zeigten.

)₂ Anzahl der Tiere mit (-) unreifen (Diapause-) oder (+) reifenden Ovarien

Injektionen von Farnesol in Kombination mit Blutfütterung und Decapitation

Der negative Ausfall der bisherigen Versuche konnte eine ernährungsphysiologische Ursache haben. Deshalb wurde in einer Serie von Versuchen die Injektion von Farnesol mit einer Blutfütterung und anschließender Decapitation innerhalb bzw. an der unteren Grenze der kritischen Periode kombiniert. Es sollte untersucht werden, ob die durch die Blutmahlzeit stimulierten Tiere - evt. aufgrund eines geringen endogenen, trotz der Decapitation erreichten Hormontiters - durch die künstlich zugeführte hormonwirksame Substanz leichter ansprechbar sind. Andererseits war es denkbar, daß die Vorbehandlung mit einer solchen Substanz die kritische Periode für die Decapitation verändert. Die Frage war also, ob sich minimale Corpora allata-Hormonmengen und Farnesol (o.ä.) in ihren Wirkungen irgendwie beeinflussen, womöglich addieren.

Farnesolinjektionen nach vorhergegangener Blutfütterung und Decapitation

Die Versuchstiere wurden 120 bis 230 Minuten nach dem Blutsaugen decapitiert. Etwa 24 Stunden später wurden ihnen nach abermaliger Kältebetäubung verschiedene Dosen von in Ringerlösung emulgiertem Farnesol injiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden sie getötet und fixiert.

Leider starben bei diesen Versuchen sehr viele Tiere. Die Decapitation verursachte innerhalb 24 Stunden einen Ausfall von durchschnittlich 60 Prozent, die Injektion führte zu einer Sterblichkeit von 70 bis 90 Prozent, und zwar unabhängig davon, ob eine mehr oder weniger konzentrierte Farnesolemulsion oder zur Kontrolle lediglich Ringerlösung injiziert worden war. Die Art der Injektion - sie erfolgte zum Teil in den Thorax, zum Teil in den Femur - hatte keinen Einfluß auf diese Verlustquote.

Die Bedingungen und Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 5 zusammengestellt. Als positiv wurden alle Tiere registriert, in denen zumindest ein Teil der Oocyten die Länge von 0,1 mm signifikant überschritten hatte. Da gelegentlich auch schon in den vorzeitig gestorbenen Tieren Anzeichen einer Ovarentwicklung zu finden waren, wurden diese hier ausnahmsweise mit aufgeführt.

Tab. 5: Kombinierte Decapitations- und Farnesol-Injektionsversuche an Aedes

Operationen	Anzahl einges. Überlbd Tiere		Sterbl %) ₁	Ergebnis) ₃	
				-	+
Decap. 135-230 Min n Bl.m.	54	17	69		
A) 0,05 µg Farnesol in 0,01 µl Ringerl.	17	4	<u>77</u> 93) ₂	14	3
Decap. 120-195 Min n Bl.m.	74	31	58		
B) 1 µg Farnesol in 0,01 µl Ringerl. (m. 2 % Tween 40)	31	5	<u>84</u> 93) ₂	22	9
Decap. 135-190 Min n Bl.m.	67	34	49		
C) 5 µg Farnesol in 0,01 µl Ringerl. (m. 3 % Tween 40)	34	3	<u>91</u> 96) ₂	24	10
5 µg Farnesol in 0,01 µl Ringerl. (m. 3 % Tween 40)	42	24	43		
D) Decap. 120-140 Min. n Bl.m.	24	3	<u>88</u> 93) ₂	24	0

)₁ innerhalb 24 Std nach dem betreffenden Eingriff

)₂ Gesamtverlust während des Versuchs

)₃ Anzahl der Tiere mit (-) unreifen (Diapause-) oder (+) reifenden Ovarien

Es zeigte sich, daß nach Applikation der größeren Farnesol-dosen (1 od 5 µg, Versuch B u C) ein höherer Prozentsatz positiver Befunde auftrat als nach Injektion von nur 0,05 µg (Versuch A), obwohl in diesem Fall das durchschnittliche Zeitintervall zwischen Blutmahl und Decapitation größer war. Das könnte als fördernde Wirkung des Farnesols gedeutet werden. In Anbetracht der hohen Sterblichkeitsziffern erlauben diese Experimente jedoch keine sichere Aussage. Für Testzwecke ist eine solche Versuchsanordnung deshalb ungeeignet.

Farnesolinjektion vor der Blutfütterung und Decapitation

Auch bei dieser Reihenfolge lag zwischen den beiden Eingriffen ein Intervall von 24 Std, und die Tiere wurden 24 Std nach dem zweiten getötet. Unter sämtlichen präparierten Tieren fand sich kein positiver Befund (s. Tab. 5). Eine Interpretation des Ergebnisses ist aus den oben erwähnten Gründen auch hier fragwürdig.

Injektionen von Farnesyl-diäthylamin in Hungerweibchen

In Versuchen von WIGGLESWORTH an *Rhodnius* (110) hat sich das Farnesyldiäthylamin als ein hochaktiver Wirkstoff mit Corpus-allatum-Hormonaktivität erwiesen. Es ist 100 bis 1000mal stärker wirksam als das Farnesol selbst. In den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob Farnesyl-diäthylamin in Hungerweibchen von *Aedes* eine Ovarreifung induziert. Im Juvenilhormontest zeigte sich, daß 0,1 - 0,5 µg dieses Stoffes die Aktivität einer Tenebrio-Einheit besitzen (111). Für die Prüfung der ovaritropen Wirkung an *Aedes* wurden 0,02 bzw 0,1 µg injiziert. Die Injektion erfolgte unter den schonendsten Bedingungen, d h nach Kältebetäubung in den Femurstumpf. Die Einzelheiten der Versuche sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Innerhalb der 1- bis 2-tägigen Inkubationszeit traten nur minimale Verluste ein. In keinem der behandelten Weibchen hatten sich die Ovarien über das Diapausestadium hinaus entwickelt.

Tab. 6: Wirkung der Injektion von Farnesyldiäthylamin auf *Aedes*-Hungerweibchen

Verdünnung	Inj. Vol.	Inj. Men- ge	Inkub. zeit	Anzahl beh. über- lbd. Tiere		Sterbl. %	Ergebnis) ₁	
							-	+
	µl	µg	Tg					
1 : 1000 in Ringerlösung	0,02	0,02	1	18	14	22	14	0
	0,02	0,02	2	18	18	0	18	0
1 : 100 in Ringerlösung	0,01	0,1	1	16	16	0	16	0
	0,01	0,1	2	23	23	0	23	0

)₁ Anzahl der Tiere mit (-) unreifen (Diapause-) oder (+) reifenden Ovarien

4. Versuche zum Studium des Normalverlaufs der Ovarentwicklung von *Calliphora erythrocephala*

Nachdem alle an *Aedes* unternommenen Versuche zur künstlichen Ovarienstimulierung ausschließlich negative Resultate gebracht hatten, erschien es angezeigt, ein anderes Versuchstier auf die Möglichkeit der experimentellen Beeinflussung seiner Ovarentwicklung hin zu untersuchen. Die Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* schien dafür geeignet. Sie steht systematisch den Stechmücken verhältnismäßig nahe. Auch bei *Calliphora* ist die Ovarreifung vom Angebot proteinhaltiger Nahrung abhängig und kann durch eine nur aus Zucker und Wasser bestehende Mangel diät (in den sog. "Zuckerfliegen") 100%ig ausgeschlossen werden.

Um den normalen Verlauf ihrer Ovarentwicklung zu studieren, wurde den Fliegen vom zweiten Lebenstage an Hefe und Milch ("Volldiät") geboten, und nach verschiedenen Zeitintervallen wurden jeweils einige von ihnen getötet.

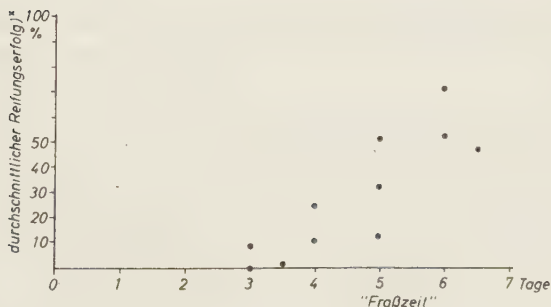


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Ovarentwicklung von *C. erythrocephala* nach Proteinfütterung

)^x mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren

In Abbildung 5 ist die Abhängigkeit der Ovarreifung von der Dauer der vorangegangenen Fütterungsperiode, kurz: der "Fraßzeit", dargestellt. Zwischen verschiedenen nach gleicher Fraßzeit unterbrochenen Serien traten erhebliche Schwankungen auf, die wahrscheinlich zum Teil durch die Aufzuchtbedingungen der Larven bedingt sind. Immerhin zeigen die Ergebnisse, daß die Ovarien der Calliphoraweibchen am 3. Tage nach Beginn der Proteinaufnahme noch kaum sichtbar verändert sind. Dann setzt die Dottereinlagerung sehr schnell ein, und am 6. Tage haben einige Weibchen bereits voll entwickelte Eier.

5. Injektion von Farnesol oder Farnesolderivaten in Calliphora-Weibchen

Bei Calliphora wurde durchweg in die abdominale Leibeshöhle injiziert.

Versuche zur Induktion der Ovarentwicklung in "Zuckerfliegen"

Diese Versuche sollten zeigen, ob in mangelernährten Calliphoraweibchen allein durch Injektion hormonaktiver Substanzen eine Ovarentwicklung auszulösen ist. Es wurden Dosen von 10 - 20 ug Farnesol injiziert. 4 - 6 Tage danach wurden die Tiere getötet und auf den Zustand ihrer Ovarien untersucht.

Zum Vergleich wurde eine Serie von Tieren bei sonst gleicher Behandlung mit Hefe gefüttert.

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen (Tab. 7):

10 - 20 ug Farnesol bewirkten in Zuckerfliegen keine Ovarienaktivierung, weder nach Injektion als Lösung in Olivenöl noch nach Applikation in konzentrierter Form. Bei den Weibchen, die am Tag nach der Injektion Volldiät erhielten, traten hinsichtlich des Reifungserfolges keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren auf. Die Vorbehandlung mit dem hormonaktiven Wirkstoff führte also nicht zu einer Beschleunigung der Ovarreifung.

Ein schwacher Effekt trat 4 Tage nach Applikation von 20 ug konz. Farnesol in den Zuckerfliegen auf (C 36): In 13 von 19 Weibchen hatten sich die Ovarien leicht vergrößert. Diese

Veränderung entspricht wahrscheinlich der von *C. allata*-Hormon unabhängigen Einlagerung der Nährzellreserven in die Oocyten (vergl. S. 14).

Tab. 7: Wirkung von Farnesolinjektionen auf die Ovarienentwicklung von *Calliphora*

Vers. Nr.	Injiz.		Inkub-zeit	"Fraß" Tg	Anzahl		Sterbl %				Ø Reifg erf.) ₂
	Menge µg	Vol µl			beh.	überlbd		-	beg	+	
a) Farnesol-Olivenöl (1:5)											
9 +12	20	0,1	5-6	Zu) ₃	34	29	15	29	-	-	0
b) konz. Farnesol											
36	10	0,01	4	Zu) ₃	20	20	0	20	-	-	0
	20	0,02	4	Zu) ₃	19	19	0	6	13	-	0
	10	0,01	4	3	20	20	0	-	12	8	7
	20	0,02	4	3	23	23	0	-	12	11	10
	K	0,02 (Ringerl)	4	3	17	17	0	1	9	7	8
	K	unbeh.	-	3	29	29	0	1	11	17	13

K = Kontrollserie (Injektion von Ringerlsg bzw unbehandelt)

-)₁ Zeitintervall zwischen Beginn der Proteinaufnahme und Tötung
-)₂ mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren
-)₃ "Zuckerfliegen"

Versuche zur Beeinflussung der Ovarienentwicklung in protein- gefütterten Calliphoraweibchen

Ausschließlich durch Wirkstoffinjektion konnte auch bei Calliphora Ovarienreifung nicht erreicht werden. In den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob die nach Aufnahme eiweißhaltiger Nährstoffe einsetzende Ovarienentwicklung durch Injektion vom hormonaktivem Material stimuliert werden kann. Dabei wurden zunächst sowohl die zu injizierende Substanz als auch die Inkubationszeit mehr oder weniger willkürlich variiert, da zu Beginn der Versuche die Bedeutung beider Faktoren unbekannt war.

Es war zu erwarten, daß für die Einwirkung auf die Ovarien der Zeitpunkt besonders geeignet ist, an dem die Follikel-epithelien ihre Tätigkeit beginnen und somit für humorale Impulse empfänglich sind, ohne jedoch schon den Höhepunkt ihrer physiologischen Aktivität erreicht zu haben, d h ungefähr der 3. Tag nach der ernährungsbedingten Induktion der Ovarienreifung (vergl. Abb. 5).

Im folgenden Abschnitt sollen zunächst die mit Farnesol und seinen Derivaten durchgeführten Versuche besprochen werden, weil nur in diesen eine positive Beeinflussung der Ovarreifung gelang.

Injektionen von Farnesol

1, 5, 20 oder 100 μg Farnesol wurden Calliphoraweibchen am 3. Tage nach Beginn der Proteinfütterung injiziert. Der daraufhin nach 1 bis 3 Tagen eingetretene Reifungserfolg wurde mit dem von Kontrolltieren der gleichen Zucht verglichen, die eine Blindinjektion von physiologischer Salzlösung erhalten hatten.

Die Daten und Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 8 zusammengestellt. Durch die unteren Dosen (1-5 μg) wurde die Ovarreifung beschleunigt (C 20), die höheren (20, 100 μg) wirkten indifferent oder sogar hemmend (C 21). Möglicherweise überwog in diesen Fällen die toxische Wirkung der injizierten Substanz. Die fördernde Wirkung des Farnesols war nach 1-tägiger Inkubation besonders signifikant, am 2. Tage nach der Injektion verminderte sich der Vorsprung der Versuchstiere gegenüber den Kontrollen.

Es ist denkbar, daß Farnesol zwar den Dottereinbau in die Follikel fördert, ohne aber gleichzeitig die Vorgänge zu beschleunigen, die für die Produktion des Dotters notwendig sind. Bei einer solchen einseitigen Stimulierung muß es nach

einiger Zeit zu einer vorübergehenden Verminderung der Dottereinbaurrate unter den Normalwert kommen.

Tab. 8 : Wirkung von Farnesolinjektionen auf die Ovarienentwicklung von Calliphora

(für den Versuch C 20 wurde eine 5%ige Emulsion von F. in Ringerlsg, für C 21 eine mit Ringerlsg. ges. Farnesol-emulsion verwandt)

Ver. Nr	Injiz.		Inkub-"Fraß" zeit) ₁		Anzahl		Sterbl %	E r g e b n i s			
	Menge µg	Vol. µl			beh	überlbd		-	beg	+	Ø Reifg- erfolg) ₂
C 20	1	0,02	1	4	13	13	0	-	1	12	18
	5	0,1	1	4	10	10	0	1	1	8	22
	K	0,1	1	4	12	12	0	-	9	3	5
	5	0,1	2	5	12	12	0	-	4	8	25
	K	0,1	2	5	15	15	0	1	9	5	19
C 21	20	0,02	2	5	22	22	0	3	8	11	14
	100	0,1	2	5	31	29	7	7	14	8	8
	K	0,1	2	5	15	14	7	3	5	6	14

K = Kontrollserie (Injektion von Ringerlsg)

)₁ Zeitintervall zwischen Beginn der Proteinaufnahme u Tötung

)₂ mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren

Injektionen von Phosphorsäureestern des Farnesols

Die positiven Wirkungen des Farnesols sowohl im Juvenilttest an Rhodnius (28) und an Tenebrio (100, 102) als auch im Ovarientest an Calliphora führten zu der Vermutung, daß diese Substanz mit dem eigentlichen Hormon oder den Hormonen der C. allata verwandt sei.

Wenn Farnesol eine biogenetische Vorstufe von C. allata-Hormon(en) ist, so kann man erwarten, daß die Farnesylphosphate wirksamer sind als der freie Alkohol. Die Phosphorsäureester sollten das geeignetere Substrat für eine metabolische Umwandlung sein.

In den folgenden Versuchen wurden Salze des Farnesylphosphates und des Farnesylpyrophosphats injiziert.

Die Injektion von Cyclohexylammonium-natrium-farnesylphosphat hat tatsächlich eine signifikante Erhöhung der Ovarienaktivität zur Folge (s.Tab. 9). Auch hier zeigte sich eine allmähliche Nivellierung der Reifungsergebnisse von Versuchs- und Kontrolltieren. Bei eintägiger Inkubation erreichten die Kontrolltiere nur den halben Reifungserfolg der Versuchstiere, nach 3-tägiger Inkubationszeit dagegen drei Viertel. Eigenartigerweise wirkte die niedrigere Dosis ($1\mu\text{g}$) hemmend auf die Ovarentwicklung (C 16 - 17), während nach Injektion der doppelten Substanzmenge ein positiver Effekt auftrat (C 17 - 18).

Injektion von Tri-lithium-farnesyl-pyrophosphat

Auch mit diesem Derivat konnte bei höherer Dosierung ($4\mu\text{g}$) eine Ovarienstimulierung erzielt werden (Tab. 9).

Nach diesen Ergebnissen unterscheiden sich die Phosphorsäurederivate des Farnesols in ihrer Wirksamkeit nicht nennenswert vom freien Alkohol. Die Frage nach dem Verhältnis von Farnesol zu den natürlichen Wirkstoffen muß deshalb offen bleiben.

Tab. 9: Wirkung der Injektion von Farnesylphosphaten auf die Ovarienentwicklung von Calliphora

Vers. Nr.	Injiz		Inkub.	"Fraß" zeit) ₁	Anzahl		Sterbl.	Ergebnis			Ø Reifg- erf.) ₂
	Menge µg	Vol. µl			beh.	überlbd		%	-	beg	
Cyclohexylammonium-natrium-farnesylphosphat (ges. Lösg in Ca-freier Ringerlsg:)											
C 18	~ 2	0,2	1	4	19	19	0	5	2	12	26
	K	0,5	1	4	19	19	0	2	10	7	13
	K	unbeh.		4	18	18	0	1	8	9	18
C 16	~ 1	0,1	2	6	8	8	0	1	2	5	40
	K	0,1	2	6	16	16	0	1	4	11	65
C 18	~ 2	0,2	2	5	21	21	0	1	4	16	57
	K	0,5	2	5	16	16	0	-	5	11	33
C 17	~ 1	0,1	3	6	15	15	0	-	2	13	50
	~ 2	0,2	3	6	10	10	0	-	-	10	80
	K	0,1	3	6	21	21	0	-	2	19	60
	K	unbeh.		6	13	13	0	-	-	13	70
Lithium-farnesyl-pyrophosphat (ges. Lösg in Ca-freier Ringerlsg:)											
C 18	~ 2	0,2	1	4	17	17	0	3	7	7	15
	~ 4	0,4	1	4	5	5	0	-	2	3	30
	K	0,5	1	4	19	19	0	2	10	7	13

K = Kontrollserie
{ Injektion von
Ringerlsg. od.
unbehandelt)

)₁ Zeitintervall zwischen Beginn der
Proteinaufnahme und Tötung
)₂ mittlere erreichte Follikellänge
in Prozent der optimal erreichbaren

Injektionen von Farnesyl-diäthylamin und Farnesyl-methyläther

In der nächsten Versuchsreihe sollte eine andere Klasse von Farnesolderivaten auf ihre humorale Wirkung in reifen Calliphoraweibchen hin untersucht werden: das Farnesyldiäthylamin und der Farnesylmethyläther. Beide Verbindungen wurden von WIGGLESWORTH erfolgreich an Rhodnius getestet (110), die

erstere im Rahmen dieser Arbeit auch an Aedes (s.S. 46), hier allerdings ohne Erfolg.

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei den vorangegangenen Experimenten. In zwei der Versuchsserien wurde einigen Weibchen (zur Kontrolle) Farnesol injiziert. Die in Tab.10 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß zwar in den farnesolbehandelten Tieren die Ovarienentwicklung angeregt wurde, nicht jedoch in denen die das Amin oder den Äther erhalten hatten. (Der Vorsprung der Versuchstiere in C 32 ist insignifikant und liegt innerhalb der Schwankungsbreite).

Tab. 10: Wirkung von Farnesyldiäthylamin und Farnesylmethyläther auf die Ovarientwicklung von Calliphora

Vers. Nr	Injiz. Menge Vol.		Inkub. "Fraß" zeit) ₁		Anzahl beh. überlbd		Sterbl %	Ergebnis			Ø Reifg- erfolg) ₂
	µg	µl	Tg					-	beg.	+	
	Farnesyldiäthylamin:										
C 30	0,05	0,05	1	4	18	18	0	-	3	15	29
	K	0,05	1	4	34	34	0	1	5	28	29
C 30	0,1	0,1	1	4	18	18	0	-	9	9	16
	K	0,1	1	4	12	12	0	-	2	10	38
C 32	0,5	0,05	1	4	27	27	0	-	3	24	32
	K	0,05	1	4	26	26	0	-	4	22	29
	Farnesol:										
	1	0,1	1	4	23	23	0	-	2	21	39
	K	0,1	1	4	20	20	0	3	2	15	32
	Farnesyldiäthylamin:										
C 31	1	0,1	1	4	26	26	0	3	13	10	15
	K	0,1	1	4	11	11	0	1	5	5	18
	Farnesylmethyläther:										
C 34	0,01	0,1	1	3	22	22	0	7	5	10	12
	0,1	0,1	1	3	20	20	0	1	8	11	14
	K	0,1	1	3	20	20	0	6	5	9	15
C 33	1	0,1	1	4	19	19	0	3	9	7	15
	K	0,1	1	4	18	18	0	3	8	7	13
	Farnesol:										
	1	0,1	1	4	22	22	0	1	5	16	25

K = Kontrollserie (Injektion von Ringerleg)

)₁ Zeitintervall zwischen Beginn d. Proteinaufnahme u. Tötung
)₂ mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren.

6. Injektionen von Insekten-Lipidextrakten in Calliphoraweibchen

In den Farnesol-Injektionsversuchen war eine Versuchsanordnung zur experimentellen Ovarienaktivierung gefunden worden. Die nachfolgend geschilderten Versuche sollten Aufschluß darüber geben, ob diese Aktivierungsreaktion auch durch Extrakte mit Juvenilhormon-Aktivität erzielt werden kann. Zwei Extrakte verschiedener Herkunft standen dafür zur Verfügung: ein durch Äther-Äthanol-Extraktion gewonnenes Öl aus trächtigen Weibchen von Leucophaea (s.S. 39) und die ölige Fraktion eines Methanolextraktes aus Bombyxköpfen. Beide hatten gute Juvenilaktivität (1 Tenebrio-Einheit in 0,25 - 0,5 ul). Sie wurden zunächst in unverdünnter Form injiziert, parallel zu Kontrollinjektionen von Olivenöl.

Die Ergebnisse der Versuche C 25 + 27 (Tab. 11 a) zeigen, daß innerhalb der angewandten Inkubationszeiten (von 1 bis 3 Tagen) keine Ovarienstimulierung eingetreten war. Die Oocyten waren im Gegenteil gegenüber den sonst nach diesen Fraßzeiten zu erwartenden Reifungserfolgen (s. Abb. 5) zurückgeblieben, und zwar sowohl die der Versuchstiere als auch die der zur Kontrolle mit Olivenöl behandelten. Meist lag der Reifungserfolg der Versuchstiere noch unter dem der Vergleichsserien.

Man muß daraus schließen, daß die Applikation körperfremder Lipide den Organismus so stark belastet, daß die Ovarreifungsvorgänge stagnieren.

In einem späteren Versuch (C 35) wurde eine Fraktion verwandt, die aus Hyalophora cecropia-Rohextrakt (s.S. 24) isoliert worden war. Um die Resorption des Hormons zu begünstigen wurde den Fliegen die ölige Lösung bereits am Tage vor Beginn der Proteinfütterung injiziert. Der Versuch wurde nach 3-tägiger "Fraßzeit" (4 Tage nach der Injektion) abgebrochen. Eine signifikante Wirkung an den Ovarien war auch diesmal nicht nachzuweisen (Tab. 11 b).

Tab. 11: Wirkung der Injektion Juvenilhormon-haltiger
Extrakte auf die Ovarienentwicklung von Calliphora

Vers. Nr.	Injiz.		Inkub- zeit) ₁ Tg	"Fraß") ₁	Anzahl		Sterbl %	Ergebnis			Reifg- erf.) ₂
	Menge µg	Vol. µl			beh.	Überlbd		-	beg	+	
a) Rohöl aus trächtigen Leucophaea-oo ⁺⁺											
C 25		0,05	1	4	13	13	0	9	4	-	0
	K	0,05	1	4	11	11	0	5	6	-	0
C 25		0,1	1	4	18	18	0	13	4	1	1
+27	K	0,1	1	4	10	10	0	6	3	1	2
C 27		0,1	1	5	10	10	0	2	4	4	8
	K	0,1	1	5	11	11	0	3	3	5	11
C 25		0,05	2	5	10	10	0	6	2	2	4
	K	0,05	2	5	8	8	0	4	4	-	0
C 27		0,1	3	6	9	8	11	5	1	2	10
	K	0,1	3	6	12	12	0	1	5	6	23
K = Kontrollserie (Injektion von Olivenöl)											
b) angereicherter Extrakt aus H. cecropia-oo ^o											
C 35		0,1	4	3	20	20	0	1	4	15	19
	K	0,1	4	3	21	21	0	1	6	14	16
		(Erdnußöl)									
	K	0,1	4	3	20	20	0	1	6	13	16
		(Ringerl.)									

-)₁ Zeitintervall zwischen Beginn der Proteinaufnahme und Tötung
)₂ mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren

Zwar wurden bei all diesen Versuchen die Flüssigkeiten in die Nähe der Ovarien injiziert und im Gegensatz zu den Erfahrungen bei Aedes wurde bei der Präparation das Öl nicht wiedergefunden, doch ist auch hier die Möglichkeit mangelhafter Verteilung des Wirkstoffes im Körper der Tiere nicht mit Sicherheit auszuschließen. Für die folgenden Versuche wurden deshalb Emulsionen der juvenilaktiven Extrakte in Ringerlösung und zum Vergleich solche von Olivenöl verwandt. In einigen Fällen wurde die Anlehnung an frühere Erfahrungen (S. 40) Tween 40 als Stabilisator zugesetzt.

Die Ergebnisse der ersten Injektionen von Tween-40-haltigen Emulsionen (Tab. 12, C 24, im Vergl. zu Abb. 5) erweckten den Verdacht, daß der Emulgator die Ovarienentwicklung hemmt. In allen Fällen blieben die Oocyten in Bezug auf die seit Proteinaufnahme verstrichene Zeit unterentwickelt. In einem weiteren Versuch wurde die Hemmwirkung von Tween 40 durch Vergleich mit völlig unbehandelten Tieren bzw. solchen, denen reine Ringerlösung injiziert worden war, bestätigt (Tab. 12, Versuch C 26). Es zeigte sich, daß 1 μ g Tween 40 innerhalb einer eintägigen Inkubationszeit die gleiche Ovariendepression bewirkt wie ca 9 μ g emulgierte Leucophaea-Lipide.

Die Frage nach der gonadotropen Wirkung von Insekten-Lipidextrakten kann deshalb nur anhand von Versuchen entschieden werden, bei denen Extraktemulsionen ohne Tween verwendet wurden. Diese Voraussetzung ist in Versuch C 22 (Tab. 12) erfüllt, eine Ovarienaktivierung konnte aber auch hier nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Bombyx-Öl und den mit Olivenöl behandelten Tieren; gegenüber den Weibchen, die eine "Ringer"-Injektion erhalten hatten, blieben beide - ohne ein Anzeichen von Dosisabhängigkeit - zurück.

Insgesamt erwiesen sich die Calliphora-Weibchen als geeigneter für Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Ovarienreifung als solche von Aedes. Sie sind einerseits sehr viel widerstandsfähiger als die Mücken und bieten andererseits durch ihre längere Ovulationsperiode besser die Möglichkeit zur Erfassung abgestufter Hemmungs- und Förderungseffekte. Die Versuche mit Farnesol zeigen, daß das sich entwickelnde Ovarium von Calliphora ein reaktionsfähiges System für künstlich zugeführte humorale Reize ist. Der 2. bis 3. Tag nach Beginn der Proteinfütterung ist für die Injektion besonders günstig; als anschließende Inkubationszeit genügt ein Tag. Der Vorsprung in der Ovarreifung ist nach erfolgreicher Injektion dann umso deutlicher, je weniger die Kontrolltiere in ihrer Entwicklung fortgeschritten sind (möglichst weniger als 50 % + Befunde).

Die Aktivierung der Calliphora-Ovarien durch Injektion von Juvenilhormon-haltigen Insekten-Lipidgemischen war in dieser Versuchsanordnung jedoch nicht möglich.

Tab. 12: Wirkung der Injektion emulgierter Insektenöle auf die Ovarienentwicklung von Calliphora

Vers. Nr	Injiz		Inkub- "Fraß"		Anzahl		Sterbl	Ergebnis		+	Reifg erfolg) ₂
	Extr.	Ges Vol µl	zeit Tg	) ₁	beh.	überlbd		-	beg		
C 24 10 % Extrakt aus tr. Leucophaea-♀♀ + 1 % Tween 40 in Ringerl.											
	0,005	0,05	1	4	14	14	0	10	4	-	0
	0,01	0,1	1	4	15	15	0	11	3	1	2
	(K	0,1	1	4	13	13	0	13	-	-	0
	(1 % Tween 40 in Ringerl.)										
	0,005	0,05	2	5	11	11	0	6	4	1	5
	0,01	0,1	2	5	10	10	0	7	3	-	0
	(K	0,1	2	5	15	15	0	7	5	3	5
	(1 % Tween 40 in Ringerl.)										
C 26 10 % Extrakt aus tr. Leucophaea-♀♀ in Ringerlsg.											
	0,01	0,1	1	5	10	10	0	5	3	2	4
	(K	0,1	1	5	10	10	0	8	1	1	3
	(1 % Tween in Ringerl.)										
	(K	0,1	1	5	10	10	0	-	7	3	11
	(Ringerl.)										
	K	unbeh.		5	10	10	0	2	4	4	12
C 22 10 % Bombyxkopf-Extrakt in Ringerlsg											
	0,005	0,05	1	4	11	11	0	2	6	3	7
	(K	0,05	1	4	11	11	0	1	5	5	9
	(10 % Olivenöl in Ringerl.)										
	0,01	0,1	1	4	12	12	0	1	7	4	7
	(K	0,1	1	4	10	10	0	3	3	4	7
	(10 % Olivenöl in Ringerl.)										
	K	0,1	1	4	12	12	0	1	4	7	12
	(Ringerl.)										

K = Kontrollserie

)₁ Zeitintervall zwischen Beginn der Proteinaufnahme und Tötung

)₂ mittlere erreichte Follikellänge in Prozent der optimal erreichbaren

III. b) Versuche zur Frage der Stoffwechsel-stimulierenden
Aktivität der Corpora allata

Von vielen Autoren wurde eine allgemeine Stoffwechsel-Wirkung der *C. allata* beschrieben. Wenn auch der dafür verantwortliche Wirkungsmechanismus noch weitgehend ungeklärt ist, so lassen doch viele dieser Beobachtungen einen Zusammenhang zwischen der von den *C. allata* kontrollierten Ovarienreifung und dem Sauerstoffverbrauch der untersuchten Insekten erkennen.

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuche sollten zeigen, ob auch bei *Aedes* eine solche Beziehung besteht. Hierzu wurden die Größe und der zeitliche Verlauf der Sauerstoff-Aufnahme von Tieren mit experimentell gestörter und ungestörter Ovarentwicklung bestimmt.

Die *Aedes*-Weibchen wurden vor den Atmungsmessungen mit Blut gefüttert und dann in verschiedenen zeitlichen Intervallen decapitiert. Erfolgte dieser Eingriff vor der kritischen Periode (vergl. S. 33), so war zu erwarten, daß infolge der geringeren Hormonkonzentration in den Geweben auch der Sauerstoff-Verbrauch der Tiere geringer blieb als bei solchen, deren *C. allata* zum Zeitpunkt der Decapitation schon genügend zur Hormonausschüttung aktiviert worden waren.

Über den Sauerstoffverbrauch decapitierter Dipteren hat R. GALUN (112) einige Erfahrungen mitgeteilt. Sie fand, daß *Aedes aegypti*-Weibchen nach Decapitation regelmäßiger atmen als intakte Tiere. Die decapitierten Tiere bewegen sich kaum, während die intakten von Zeit zu Zeit spontane Bewegungsphasen haben, durch welche die Atmungsaktivität auf ein Vielfaches des Ruhewertes erhöht wird. Merkwürdigerweise haben die decapitierten Weibchen insgesamt jedoch einen mindestens ebenso großen Sauerstoffverbrauch wie die intakten Vergleichstiere. Ihr Ruhestoffwechsel ist also eklatant erhöht; GALUN führt dies auf die Ausschaltung eines hemmenden Zentrums im Kopf zurück.

Für die Versuche wurden jeweils etwa fünf Versuchstiere in einen Warburg'schen Atmungstrog überführt und die sich aus ihrem Sauerstoffkonsum bei 20°C. ergebenden Druckdifferenzen registriert. Das Kohlendioxyd wurde durch Kalilauge absorbiert.

Der Sauerstoffverbrauch von Aedes aegypti-Weibchen während der beginnenden Ovarreifung

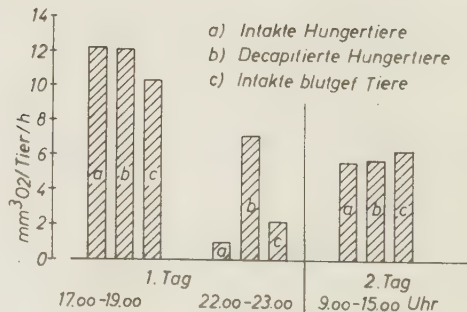
In einem ersten Versuch (AR 1) wurde der Sauerstoffverbrauch von intakten und von decapitierten Hungerweibchen mit dem intakter blutgefütterter Weibchen von Aedes verglichen. Der Versuch wurde an einem Nachmittag begonnen, und in der darauffolgenden Nacht sowie am nächsten Tage wurden weitere Messungen durchgeführt.

In Abbildung 6 (AR 1) sind die Ergebnisse dargestellt. Sie zeigen, daß die intakten Hungertiere am Tage einen 6- bis 12-mal so großen Sauerstoffverbrauch hatten wie in der Nacht, ein Ausdruck der auf die Tagesstunden beschränkten lokomotorischen Aktivität. Die nahezu bewegungslosen decapitierten Hungertiere unterscheiden sich tagsüber kaum von den intakten (in Übereinstimmung mit GALUN), nachts zeigten sie jedoch eine sehr viel höhere respiratorische Aktivität als jene. Während der Nachtruhe fällt die durch die Decapitation bewirkte Erhöhung des Grundumsatzes besonders stark auf.

Abb. 6

O₂-Verbrauch von A. aegypti-Weibchen unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Versuch AR₁; Einzelheiten im Text)

Die Kolonnen beziehen sich auf Durchschnittswerte von 5 (a,c) od. 10 (b) Tieren.



Durch die Decapitation der Tiere wird der Tag-Nacht-Rhythmus ihres respiratorischen Stoffwechsels ausgeschaltet (vergl. Versuch AR₂, Abb. 7). Es tritt lediglich eine über Tag und Nacht stetig verlaufende Abnahme der Atmungsgröße auf, die offensichtlich mit der allmählichen Aushungerung zusammenhängt.

Der Sauerstoffverbrauch der intakten blutgefütterten Tiere lag am ersten Tag etwas unter dem der beiden anderen Serien, erreichte aber immerhin einen Wert, der - in Anbetracht der fast völligen Bewegungslosigkeit dieser Weibchen - auf einen erhöhten Ruhestoffwechsel schließen läßt. Während der Nacht war die Sauerstoffaufnahme bei diesen Tieren mehr als doppelt so groß wie bei den Hungertieren, am zweiten Tag glichen sich die Differenzen allmählich aus.

Im nächsten Versuch (AR 2) wurde der Sauerstoffverbrauch von ungefüttert decapitierten Weibchen mit dem solcher verglichen, die entweder kurze Zeit (70 - 90 Min.) oder sehr lange Zeit (24 Std.) nach ihrer Blutmahlzeit decapitiert worden waren. Die Messungen wurden am Tage der Decapitation und am darauffolgenden Tage zu drei verschiedenen Tageszeiten (Vormittag, Nachmittag, Abend) durchgeführt (s. Abb. 7).

Zwar lag der Verbrauch der blutgefütterten stets über dem der Hungerweibchen, doch ergab sich nicht die erwartete quantitative Korrelation zwischen dem Fütterungs-Decapitations-Intervall und dem respiratorischen Stoffwechsel. Im Gegenteil zeigten die Tiere, die noch vor der kritischen Periode decapitiert worden waren, einen höheren Sauerstoffverbrauch als diejenigen, die 24 Stunden lang nach der Blutmahlzeit intakt geblieben waren.

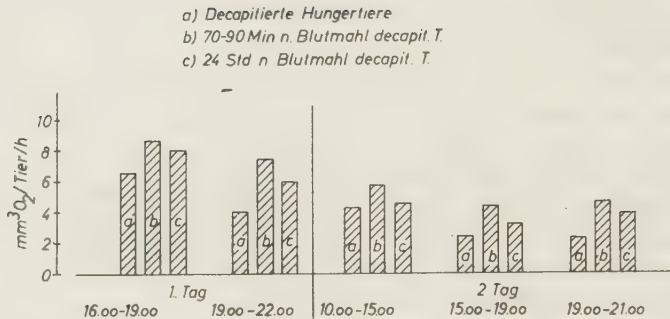


Abb. 7: O_2 -Verbrauch von *A. aegypti*-Weibchen unter verschiedenen Versuchsbedingungen

(Versuch AR₂; Einzelheiten im Text)

Die Kolonnen beziehen sich auf Durchschnittswerte von 5 (a,b) bzw 6 (c) Tieren.

Die Ergebnisse beider Versuche finden eine zwanglose Erklärung in der Annahme, daß

1. die Aufnahme der Blutmahlzeit eine Vergrößerung des Ruhestoffwechsels mit zeitlichem Dekrement auslöst und
2. die Decapitation nach einem von jenem unabhängigen Mechanismus zu erhöhter Sauerstoffaufnahme von bestimmtem Zeitverlauf führt.

Diese beiden Stimuli interferieren miteinander, und der gesamte Gasaustausch der Tiere ist jeweils die Resultierende dieser beiden Komponenten.

Von dieser Erfahrung ausgehend, wurden die folgenden Versuche so eingerichtet, daß zum Zeitpunkt der Messung die Tiere sowohl hinsichtlich der seit der Fütterung als auch der nach der Decapitation verstrichenen Zeit vergleichbar waren.

Die Mücken wurden zunächst zwei bis drei Tage nach dem Schlüpf-

fen ohne Nahrung gehalten, dann mit Blut gefüttert und ein bis mehrere Stunden danach decapitiert. Erst am Morgen des darauffolgenden Tages begannen die Atmungsmessungen. Die Durchschnittswerte des während dreier Vormittagsstunden gemessenen Sauerstoffverbrauches sind in Abbildung 8 veranschaulicht.

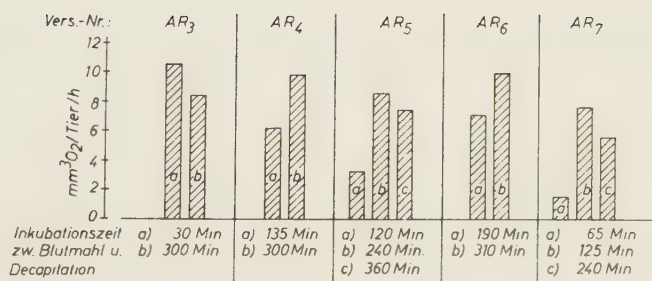


Abb. 8: Abhängigkeit des O_2 -Verbrauchs von *A. aegypti*-Weibchen vom Zeitintervall zwischen Blutfütterung und Decapitation

Die Kolonnen beziehen sich auf Durchschnittswerte von 5 Tieren (in AR₃b u AR₄ wurden nur 3, in AR₃a u AR₅a 4 Tiere gemessen).

Fast immer hatten die Tiere den niedrigeren Sauerstoffverbrauch, die vor oder zu Beginn der kritischen Periode deca-

pitiert worden waren. Etwas unübersichtlich wird das Bild durch die erheblichen Schwankungen zwischen vergleichbaren Serien der verschiedenen Versuche und durch die Tatsache, daß bei den Versuchen AR 5 und AR 7 die mittleren und nicht die zuletzt geschnürten Serien die höchste Atmungsaktivität aufwiesen. Diese Differenzen entsprechen aber durchaus denen, die nach 48-stündiger Inkubationszeit im Ovarreifungserfolg einzelner Tiere beobachtet wurden (vergl. Abb4). Ungeklärt bleibt der hohe Sauerstoffverbrauch der nur 30 Minuten nach Blutfütterung decapitierten Tiere (AR 3).

Die mehrfach gefundene Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs bei Weibchen, die vor der kritischen Periode decapitiert worden waren, spricht dafür, daß dieser durch den C. allata-Hormontiter beeinflusst wird.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Versuche zur Bestimmung der kritischen Periode bei *Aedes* führten zur Bestätigung der von GILLETT (68,69) angegebenen Werte. Die in dieser Frage zwischen LARSEN und GILLETT bestehende Diskrepanz dürfte durch die verschiedene Inkubationszeit zu erklären sein. GILLETT tötete die Tiere - ebenso wie wir - 48 Stunden nach der Blutfütterung, LARSEN ließ sie mindestens 4 Tage am Leben. Wie unsere Versuche gezeigt haben, verhindert Decapitation zu Beginn der kritischen Periode die Eireifung zwar nicht vollständig, führt aber doch zu einer starken Verzögerung. Es müssen also nach längerer Inkubation mehr Weibchen mit partiell oder vollständig gereiften Ovarien erscheinen, als bei vorzeitiger Unterbrechung des Versuchs.

Die geschilderten Injektionsversuche zeigen, daß sich der experimentellen Induktion der Ovarienentwicklung große Schwierigkeiten entgegenstellen.

LARSEN und BODENSTEIN (70) fanden in einigen Fällen bei *Aedes* positive Wirkungen von Extrakten zweier verschiedener Schabenarten. Sie verschweigen allerdings die Dosen und Inkubationszeiten ihrer Versuche. Am gleichen Objekt konnten wir trotz Variation der Versuchsbedingungen keine derartigen Effekte erzielen. Da auch in unseren Versuchen u. a. Schabenextrakte verwandt wurden, sind die abweichenden Ergebnisse sicher nicht durch die Wirkstoffzusammensetzung zu erklären.

Nachdem sich auch Farnesol und Farnesyldiäthylamin, Modellsubstanzen mit hoher *C. allata*-Hormon-Aktivität, an *Aedes* als wirkungslos erwiesen haben, halten wir *Aedes* für ungeeignet zum Studium der vitellogenen Aktivität von Wirkstoffen oder Wirkstoffgemischen.

Auch an *Calliphoraweibchen* waren alle Versuche zur Ovarienaktivierung durch juvenilhormonhaltige Extrakte erfolglos. Nur durch Applikation reiner Stoffe (Farnesol und Derivate) konnte eine positive Reaktion ausgelöst werden (s. Abb. 9).

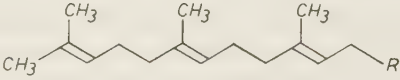
		Erfolg
Farnesol	$R = -OH$	+
Farnesylphosphat	$R = -O-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O^{\ominus}}{\uparrow}}{P}}-O^{\ominus}$	+
Farnesylpyrophosphat	$R = -O-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O^{\ominus}}{\uparrow}}{P}}-O-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{O^{\ominus}}{\uparrow}}{P}}-O^{\ominus}$	+
Farnesylmethylläther	$R = -O-CH_3$	-
Farnesyl-diäthylamin	$R = -N \begin{cases} CH_2-CH_3 \\ CH_2-CH_3 \end{cases}$	-

Abb. 9: Übersicht der an *Calliphora* auf vitellogene Wirkung geprüften Farnesylverbindungen

Die von Farnesol dafür erforderliche Dosis von 1 - 5 µg entspricht der im Tenebrio-Test für die Auslösung einer lokalen Juvenilwirkung benötigten (111). Beide liegen erheblich unter den Mengen (50 - 250 µg), die bei *Rhodnius* für eine juvenile oder vitellogene Reaktion gebraucht werden (WIGGLESWORTH, 110).

Durch Farnesylmethylläther (bis zu 1 µg) konnte in *Calliphora* keine Wirkung erzielt werden; bei *Rhodnius* wurde durch 2 - 100 µg eine dosisabhängige Eiproduktion ausgelöst. In *Calliphora* wur-

den Emulsionen, in *Rhodnius* eine ölige Lösung injiziert. Es liegt deshalb nahe, die unterschiedliche Reaktion durch die verschiedene Art der Applikation zu erklären.

Unabhängig davon bleibt es bemerkenswert, daß Farnesylmethyläther, der sowohl im *Tenebrio*- als auch im *Rhodnius*-Juvenilttest 100-mal so aktiv ist wie Farnesol, keine oder nur sehr schwache vitellogene Wirksamkeit besitzt.

Durch Farnesylphosphate, die sich an *Calliphora* als vitellogen erwiesen, konnte bisher niemals eine Juvenilwirkung hervorgerufen werden (110, 111). Es bleibt zu untersuchen, ob dies auf mangelnder Wirksstoffeigenschaft beruht oder nur auf der Schwierigkeit, diese Stoffe für den Juvenilttest in Öl zu lösen.

Die Annahme der Identität von Juvenilhormon und vitellogenem Hormon der Insekten erscheint uns durch die Tatsache, daß beiderlei Wirkungen durch Farnesol und einige seiner Derivate imitiert werden können, nicht ausreichend begründet. Die quantitativen Unterschiede in der Wirksamkeit von Farnesol und Farnesylmethyläther können eher im gegenteiligen Sinne interpretiert werden.

Welche Beziehung zwischen Farnesol und seinen Derivaten auf der einen und *C. allata*-Hormon(en) auf der anderen Seite besteht, kann heute nicht mit Sicherheit gesagt werden. Daß sie miteinander identisch sind, ist unwahrscheinlich (s.S. 24); daß aber biogenetische Zusammenhänge oder strukturelle Ähnlichkeiten bestehen, ist durchaus möglich. Es wird weiteren chemischen und biologischen Untersuchungen vorbehalten bleiben, diese Frage endgültig zu klären.

Die hier erarbeitete Versuchsanordnung zur Stimulierung der bereits angelaufenen Oogenese bei *Calliphora* eignet sich für einen sehr empfindlichen Test auf vitellogen wirkende Substanzen. Es ist nicht anzunehmen, daß das natürliche Hormon zur Entfaltung nachweisbarer Wirkungen andere Bedingungen benötigt als die in dieser Arbeit verwandten Modellsubstanzen. Um denselben Erfolg mit Fraktionen aus Insektenextrakten zu erzielen, bedarf es sicherlich nur einer größeren Anreicherung des in ihnen enthaltenen Hormons.

C ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Ermittlung einer für die vitellogene Wirkung von Corpora allata-Hormon geeigneten Testmethode wurden an *Aedes aegypti* und *Calliphora erythrocephala* Injektionsversuche mit Insekten-Lipidextrakten und verschiedenen C. allata-Hormon-aktiven Substanzen durchgeführt.
2. In nicht blutgefütterten Aedesweibchen ließ sich weder durch Injektion von Juvenilhormon-haltigen Extrakten verschiedener Herkunft (*Bombyx*, *Leucophaea*) noch durch reine Wirkstoffe mit Juvenilhormonaktivität (Farnesol, Farnesyldiäthylamin) Ovarienreifung induzieren.
3. Bei kombinierten Versuchen mit Blutfütterung, Decapitation und Injektion von Farnesol starben über 90 Prozent der Mücken. Die wenigen Überlebenden erlauben keine sichere Aussage über die Wirkung des Farnesols.
4. In "Zuckerfliegen" brachte eine Dosis von 20 µg Farnesol (unverdünnt injiziert) zwar eine minimale Ovarienaktivierung, führte jedoch innerhalb von 4 Tagen nicht zum Einbau von Dotter in die Oocyten. Wurde die gleiche Menge Farnesol in Olivenöl injiziert, so zeigten die Ovarien innerhalb von 5 - 6 Tagen überhaupt keine Reaktion.
5. In vollernährten Calliphoraweibchen blieben 20 µg konz. Farnesol bei 4-tägiger Inkubationszeit ohne Wirkung.
6. Proteingefütterte Fliegen mit reifenden Ovarien erwiesen sich als geeignetes Testobjekt für vitellogen wirkende Substanzen. Sie reagieren am empfindlichsten, wenn die Wirkstoffe zu der Zeit injiziert werden, zu der die Dotter-einlagerung in die Oocyten beginnt.
7. Wurde emulgiertes Farnesol in solche Tiere injiziert, so trat bei einer Dosis von 1 µg nach 1-tägiger, von 5 µg nach 1 - bis 2-tägiger Inkubation eine signifikante Ovarienaktivierung ein. Dosen von ca 20 µg oder ca 100 µg erwiesen sich innerhalb von 2 Tagen als indifferent bzw sogar hemmend. Es ist anzunehmen, daß durch Überdosierung ein toxischer Effekt verursacht wird.

8. Ähnlich dem Farnesol wirkten Salze seiner Phosphorsäure-ester. Cyclohexylammonium-natrium-farnesylphosphat hatte nach Injektion von etwa 1 - 2 μg als physiologische Salzlösung einen über 3 Tage anhaltenden positiven Effekt. Trilithium-farnesyl-pyrophosphat wurde nur innerhalb einer eintägigen Inkubationszeit geprüft und zwar mit 4 μg ovarien-aktiv.
9. 0,01; 0,1 oder 1 μg Farnesylmethyläther sowie 0,05; 0,1; 0,5 oder 1 μg Farnesyldiäthylamin, als wässrige Emulsion injiziert, blieben nach eintägiger Inkubationszeit ohne Wirkung.
10. Nach Injektion juvenilhormonhaltiger Insekten-Lipidextrakte konnten bei Calliphora in keinem Fall Anzeichen für eine Ovarienaktivierung festgestellt werden, gleichgültig, ob dabei die Extrakte als unverdünnte Öle oder als Emulsion gegeben wurden. Sie führten im Gegenteil meistens zur Ovarieninhibierung.
11. Die kritische Periode beginnt bei Aedes etwa 4 Stunden nach der Blutaufnahme. Werden die Tiere 4 - 5 Stunden nach der Fütterung decapitiert, so erreichen ihre Ovarien innerhalb von 48 Stunden ein mittleres Reifungsstadium, sind aber niemals so weit entwickelt wie Ovarien intakter Weibchen nach der gleichen Inkubationszeit.
12. Durch Atmungsmessungen an intakten und decapitierten Weibchen von Aedes wurde eine Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs vom Corpora allata-Hormonspiegel wahrscheinlich gemacht.
13. In verschiedenen Stadien der Schabe Leucophaea maderae wurde der Juvenilhormongehalt bestimmt. Trächtige Weibchen ergaben den wirksamsten Extrakt (45 - 49), nicht trächtige Weibchen (24 - 34) und Männchen (21 - 24) Extrakte mittlerer Aktivität, während der Extrakt aus Larven vollkommen inaktiv war (0 % positive Befunde im Tenebrio-Juvenilttest).

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) HASSENSTEIN B., Naturwissensch. Rdsch. 13: 349 - 355, 373 - 382 und 419 - 424 (1960)
- 2) MITTELSTAEDT H., Ann. Rev. Entomol. 7, 177 - 198 (1962)
- 3) SCHNEIDER D. u E. HECKER, Z. Naturforsch 11 b, 121 - 124 (1956)
SCHNEIDER D. u J. BOECKH, Z. vergl Physiol. 45, 405-412 (1962)
- 4) KARLSON P. u A. BUTENANDT, Ann.Rev. Entomol. 4, 36 - 58 (1959)
KARLSON P. u M. LÜSCHER, Naturwiss. 46, 63 - 64 (1959)
KARLSON P., Erg. d Biol. XXII, 212 - 225 (1960)
- 5) BUTENANDT A. u P. KARLSON, Z. Naturforsch 9 b, 389 (1954)
- 6) GILBERT L.I. u H.A. SCHNEIDERMAN, Am Zool. 1, 11 - 51 (1961)
- 7) KARLSON P., 13.Mosbacher Colloquium, Springer-Verlag, 1962, S. 101 - 126
- 8) KARLSON P., in M. Florkin, 'Comprehensive Biochemistry', Vol II, 168 - 178, Elsevier Publ. Comp, 1963,
- 9) KARLSON P. u C.E. SEKERIS, in M. Florkin u H.A. Mason, 'Comparative Biochemistry', Vol VI, im Druck, Academic Press, 1963
- 10) CLEVER U. u P. KARLSON, Exp. Cell Res. 20, 623 - 626 (1960)
- 11) CLEVER U., Chromosoma 12, 607 - 675 (1961)
- 12) KARLSON P., Perspectives in Biology and Medecine (1963)
Umschau in Wissensch u Technik, (1963)
- 13) POLICE G., Arch. Zool. Ital. 4 (1910)
- 14) NABERT A., Z. wiss. Zool 104 (1913)
- 15) HANSTRÖM B., Biologia generalis 15 (1942)
- 16) THOMSEN E., Naturw. 29, 605 - 6 (1941)
- 17) VOGT M., Naturw. 29 (1941)
- 18) WIGGLESWORTH V.B., Physiology of Insect Metamorphosis
Cambridge University Press, 1954
- 19) WIGGLESWORTH V.B., J. Exp. Biol. 17, 201 - 222 (1940)
- 20) PFLUGFELDER O., Entwicklungsphysiologie der Insekten
Akad. Verlagsges. Geest & Portig, Leipzig
a) 1. Aufl: 1952
b) 2. Aufl: 1958

- 21) LÜSCHER M. u F. ENGELMANN, J. Ins. Physiol. 5, 240-258 (1960)
- 22) WIGGLESWORTH V.B., J. Exp. Biol 25, 1 - 14 (1948)
- 23) BODENSTEIN D. J. Exp. Zool. 123, 413 - 434 (1953)
- 24) WIGGLESWORTH V.B., J. Exp. Biol 29, 620 - 631 (1952)
- 25) WIGGLESWORTH , J. Exp. Biol 32, 485 - 491 (1955)
- 26) GILBERT L.I., Nature 193, 1205 - 7 (1962)
- 27) SCHNEIDERMAN H.A. u L.I. GILBERT, Biol. Bull. 115, 530-35(1958)
- 28) WIGGLESWORTH V.B., Z. Naturforsch. 16 b, 463 (1961),
J. Ins. Physiol. 7, 73 - 78 (1961)
- 29) LÜSCHER M. u A. SPRINGHETTI, J. Ins. Physiol. 5, 190-212 (1960)
- 30) JOLY P., Insectes sociaux III (1956)
Congr. U.I.E.I.S. Pavis (1961)
- 31) WEED'PFEIFFER I., J. Exp. Zool. 99, 183 - 233 (1945)
- 32) JOLY P., C.R. Soc. Biol., Paris 145 (1951)
C.R. Acad. Sci., Paris 235 (1952)
- 33) BÜCKMANN D., J. Ins. Physiol. 3, 159 - 190 (1959)
- 34) LOHER W., Proc. Roy. Soc. B 153, 380 - 397 (1961)
- 35) LÜSCHER M. u F. ENGELMANN, Rev. Suisse de Zool. 62,
649 - 657 (1955)
- 36) THOMSEN E., J. Exp. Biol. 26, 137 - 149 (1949)
- 37) THOMSEN E. u K. HAMBURGER, J. Exp. Biol 32, 692 - 699 (1955)
- 38) WILDE J.de u D. STEGWEE, Arch. neal. Zool. 13, 277-289(1958)
- 39) NOVAK V.J.A., K. SLAMA u K. WENIG,
Symp. Evol. Insect. Praha 1959, S. 147 - 151
- 40) NOVAK V.J.A. u K. SLAMA, J. Ins. Physiol. 8, 145 - 153(1962)
- 41) SÄGESSER H., J. Ins. Physiol. 5, 264 - 285 (1960)
- 42) NEUGEBAUER W., Roux' Arch. Entw-mech. 153, 314 - 352 (1961)
- 43) L'HELIAS C., C.R. Acad. Sci., Paris, 239, 778 - 780 (1954)
- 44) SAMUELS A., Biol. Bull. 110, 179 - 183 (1956)
- 45) THOMSEN E., J. Exp. Biol. 29, 137 - 172 (1952)
- 46) L'HELIAS C., C. R. Acad. Sci., Paris 236, 2164 - 66
2489 - 91 (1953)
- 47) L'HELIAS C., Physiol. Comp. et Oecol. IV, 74 - 88 (1955)

- 48) WIGGLESWORTH V.B., Quart. J. Micr. Sci. 79, 91 - 121 (1936)
- 49) THOMSEN E., Vidensk.Medd.Dansk naturh.Foren. Kbh. 106,
319 - 405 (1942)
- 50) WEED I.G. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34, 883 - 5 (1936)
- 51) SCHARRER B., Endocrinol. 38, 46 - 55 (1946)
- 52) ENGELMANN F., J. Ins. Physiol. 1, 257 - 278 (1957)
- 53) DAY M., Biol. Bull. 84, 127 - 140 (1943)
- 54) WILDE J.de, XI. Intern.Kongr. Entomol. Wien 1960, S.215-217
- 55) CHEN P.S., J. Ins. Physiol. 3, 335 - 344 (1959)
- 56) CLEMENTS A.N., J. Exp. Biol. 33, 211 - 223 (1956)
- 57) TWOHY D.W. u ROZEBOOM L.R., Am. J. Hyg. 65, 316-324 (1957)
- 58) SPIELMAN A., Am. J. Hyg. 65, 404 - 425 (1957)
- 59) OZEKI K., Zool. Mag. Tokyo, 58, 232 - 236 (1949)
- 60) GIRARDIE A., J. Ins. Physiol. 8, 199 - 204 (1962)
- 61) JOHANSSON A.S., Nature 174, 89 (1954)
- 62) JOLY P., Arch. Zool. exp. gen. 84 (1945)
- 63) JOLY P., C.R. Soc. Biol. 144 (1950)
- 64) VOGT M., Biol. Zbl. 60, 479 - 484 (1940)
Arch. Entw. Mech. Org. 140, 525 - 546 (1940)
- 65) VOGT M., Biol. Zbl. 61 242 - 252 (1941)
- 66) VOGT M., Roux' Arch. Ent-mech. 141, 424 - 454 (1942)
- 67) DETINOVA T.S., Zool. Zhur., Moscow 24, 291 - 298 (1945)
- 68) GILLETT J.D., Ann.Trop.Med.Parasitol. 50, 375 - 380 (1956)
- 69) GILLETT J.D., Nature 180, 656 - 657 (1957)
- 70) LARSEN J.R. u D. BODENSTEIN, J. Exp. Zool. 140, 343-382(1959)
- 71) WEED'PFEIFFER I., J.Exp. Zool. 82, 439 - 461 (1939)
- 72) GILLETT J.D., J.Exp. Biol. 35, 685 - 693 (1958)
- 73) SCHEER B.T., in 'Vitamins and Hormones', Vol. XVIII,
S. 141 - 204, Academic Press, 1960
- 74) WIGGLESWORTH V.B., Nature 174, 556 (1954)
- 75) BOUNHIOL J.J., C.R.Ac.Sci. Paris 203 (1936), 205 (1937)
- 76) WILLIAMS C.M., Biol. Bull. 116, 323 - 338 (1959)
- 77) FUKUDA S., J.Fac.Sc. Tokyo Imp.Univ.Sec⁴, 477 - 532 (1944)

- 78) YAMASHITA Y., K. TANI u M. KOBAYASHI, Sansi-Kenkyu
39, 12-15 (1961)
- 79) BODENSTEIN D., Biol Zbl. 58 (1938)
- 80) WILLIAMS C.M., Biol Bull 93, 89 - 98 (1947)
- 81) WIGGLESWORTH V.B., Quart. J. Micr. Sci. 77, 191-222 (1934)
- 82) STRANGWAYS-DIXON J., J. Exp Biol 38, 637 - 646 (1961)
- 83) STRANGWAYS-DIXON , J. Exp Biol 39, 293 - 306 (1962)
- 84) BODENSTEIN D., J. Exp Zool 104, 101 - 152 (1947)
- 85) HANSTRÖM B., Nature 171, 72 (1953)
- 86) VOGT M., Biol Zbl 63 (1943)
- 87) PFLUGFELDER O., Z. wiss. Zool 153, 108 - 135 (1940)
- 88) WEED-PFEIFFER I., Trans.Conn.Acad. Arts Sci 36, 489-515(1945)
- 89) VOGT M., Nature 157, 512 (1946)
- 90) NOVAK V.J.A., Nature 167, 132 (1951)
- 91) POSSOMPES B., Arch. Zool. Exp. Gen. 89 (1953)
- 92) PIEPHO H., Biol Zbl. 58, 481 - 495 (1938)
- 93) PIEPHO H., Biol Zbl. 78, 417 - 424 (1959)
- 94) WILLIAMS C.M., Nature 178, 212 - 213(1956)
- 95) SCHNEIDERMAN H.A. u L.I. GILBERT, Anat. Rec. 128, 618 (1957)
- 96) GILBERT L.I. u H.A. SCHNEIDERMAN, Anat. Rec. 131, 557 (1958)
- 97) GILBERT L.I. u H.A. SCHNEIDERMAN, Gen. Comp. Endocrinol 1,
453 - 472 (1961)
- 98) WILLIAMS G.M., L.V. MOORHEAD u J.F. PULIS, Nature 183,
405 ('59)
- 99) SCHNEIDERMAN H.A., L.I. GILBERT u M. WEINSTEIN,
Nature 188, 1041 - 42 (1960)
- 100) SCHMIALEK P., Z. Naturforsch. 16 b, 461 - 464 (1961)
- 101) WILLIAMS C.M., I. Intern. Congr. Endocrinol, Copenhagen 1960
- 102) KARLSON P. u M. NACHTIGALL, J. Ins. Physiol 7, 210-215 (1961)
- 103) KARLSON P. u P. SCHMIALEK, Z. Naturforsch 14 b 821 (1959)
- 104) YAMAMOTO R.T. u M.JACOBSON, Nature 196, 908 - 9 (1962)
- 105) WIGGLESWORTH V.B., J. Ins. Physiol. 2, 73 - 84 (1958)
- 106) GILBERT L.I. u H.A. SCHNEIDERMAN, Trans. am. Micr. Soc.79,
38-67 (1960)

- 107) BERGOLD G., Biol. Zbl. 61, 158 - 162 (1941)
- 108) EPHRUSSI B. u G.W. BEADLE, Am. Naturalist 70,
218 - 225 (1936)
- 109) WEAVER N. u R.C. THOMAS, Stain Technol. 31, 1 (1956)
- 110) WIGGLESWORTH V.B., J. Ins. Physiol. 9, 105 - 120 (1963)
- 111) KARLSON P. u H. EHMKE, unveröffentl Experimente
- 112) GALUN R., Nature 185, 391 - 392 (1960)

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Wilhelm Weirich und seiner Ehefrau Gertrud, geb Steinert, am 17. Februar 1934 in Eisenach/Thür geboren, besuchte ich daselbst mit Unterbrechungen von 1940 bis 1948 die Grundschule und von 1948 bis 1952 die Ernst Abbe-Oberschule, an der ich im Mai 1952 in der Naturwissenschaftlichen Abteilung die Reifeprüfung ablegte.

Während meine wiederholten Bewerbungen zum Studium der Biologie von verschiedenen Universitäten der DDR stats abgelehnt wurden, absolvierte ich von 1952 bis 1954 in den Eisenacher Motorenwerken eine Lehre als Chemielaborant. Danach verließ ich die DDR und arbeitete ein halbes Jahr lang bei der Gewerkschaft Wintershall AG in Heringen/Werra als Volontär.

Im Sommersemester 1955 begann ich nach erfolgreicher Ergänzungsprüfung zum Abitur an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem naturwissenschaftlichen Grundstudium (Hauptfach: Zoologie). Dieses Studium setzte ich von Wintersemester 1957/58 bis 1958/59 an der Georg-August-Universität Göttingen und anschließend an der Ludwig-Maximilians-Universität München fort. Am Physiologisch-Chemischen Institut dieser Universität begann ich im Frühjahr 1960 unter Anleitung von Prof Dr Peter Karlson mit der vorliegenden Arbeit.



